

---

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

---

(11)Publication number : 08-226918  
(43)Date of publication of application : 03.09.1996

---

(51)Int.Cl.

G01N 33/53  
C12N 15/02  
C12P 21/08  
G01N 33/573  
G01N 33/577  
// (C12P 21/08  
C12R 1:91 )

---

(21)Application number : 07-053794  
(22)Date of filing : 20.02.1995

(71)Applicant : FUJI YAKUHI KOGYO KK  
(72)Inventor : FUJIMOTO NOBORU  
YAMASHIRO TAKAYUKI  
HOSOKAWA NOBUKO  
TOKAI HIDEAKI  
SHINAGAWA AKIRA  
YOSHIDA SHINICHI  
IWATA KAZUSHI

---

**(54) METHOD FOR FRACTIONAL DETERMINATION OF FREE ACTIVATED MATRIX METALLOPROTEASE**

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a simple and quick fractional determination method of activated matrix metalloproteases(MMPs) directly related to decomposition of matrix components among the MMPs existing in a tissue or humor to enable diagnosis or monitor of pathology such as a disease aggravated by activation of the MMPs, arthrosis, infiltration or metastasis of cancer and pulmonary fibrosis.

CONSTITUTION: For highly sensitive, highly accurate and quick fractional determination of activated MMPs with simple operation and reagent, a combination of monoclonal antibodies specifically bonding to each MMP and a tissue inhibitor of metalloprotease(TIMPs) or a composite comprising TIMPs and monoclonal antibodies specifically bonding to each TIMP is used. In particular, one of solid phase carrier bonding substance and a label applying substance is a monoclonal antibody specifically bonding to the matrix metalloprotease, while the other is an inhibitor of the matrix metalloprotease, wherein they are preferably used respectively in combination.

---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]	02.04.1996
[Date of sending the examiner's decision of rejection]	16.06.1998
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]	
[Date of final disposal for application]	
[Patent number]	2864219
[Date of registration]	18.12.1998
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]	10-10816
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]	15.07.1998
[Date of extinction of right]	

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] this invention relates to a medical physiological field, and relates to the judgment assay of the active type MMPs of the matrix METARO proteases (MMPs) of isolation, and especially isolation. this invention is tissue which is each monoclonal antibody which will be specifically combined to MMPs if it says in more detail, and the inhibitor of MMPs. Inhibitor It is related with the method of carrying out the judgment fixed quantity of the active type MMPs of isolation using OBUME taro proteases (TIMPs).

[0002]

Background of the Invention] The matrix outside a cell consists of adhesive glycoproteins, such as a collagen, a proteoglycan, an elastin, a fibronectin, and a laminin, (677 Martinez-Hernandez et al., Lab. Invest., 48,656- 1983). It is well-known to have played the role with matrix METARO proteases (MMPs) important for decomposition of these matrices component. The kind and numbering of MMP known are as follows. A stromata type collagenase (MMP-1), a 72kilodalton (kD) gelatinase (MMP-2), The strike ROM lysin -1 (MMP-3), PUMP-1 (MMP-7), A neutrophil-leucocyte collagenase (MMP-8), 92kD gelatinase (MMP-9), The strike ROM lysin -2 (MMP-10), the strike ROM lysin -3 (MMP-11), A macrophage METARO elastase (MMP-12), They are a collagenase -3 (MMP-13) and a membrane type MMP (MT-MMP, MMP-14) (H.). Birkedal-Hansen et al., Oral Biol. Med., 4, 197-250, ] [ 1993; S.D. Shapiro ] et al., J. Bio. Chem., 268, 23824-23829, 1993; J.M.P. Freje et al., J. Biol. Chem., 269, 16766-16773, and 1994; H. Sato et al., Nature, 370, and 61- 65 and 1994

[0003] MMPs is compounded and produced within a cell and is emitted as a precursor (a pro object or latent type) out of a cell if needed. Latent type MMPs consists of a pro peptide, an active-center field (central field), a carboxyl-terminus field, etc. from the amino terminus. The latent type MMPs itself does not participate in decomposition of a matrix component, but it is activated by a plasmin, MMP-3, etc. in response to limited decomposition in a body. Or an amino-terminus pro peptide is experimentally cut by the thiol-group reactivity organomercurous compound etc., and it becomes an active type MMPs. Decomposing the matrix component corresponding to each substrate is known (250 H. Birkedal-Hansen et al., Oral Biol. Med., 4, 197- 1993). Moreover, tissue which is the inhibitor of MMPs which checks MMPs activity specifically in an organization or body fluid Inhibitor OBU It is known that METARO proteases (TIMPs) exist (114 T. Hayakawa, Cell struct. Funct., 19, 109- 1994). Three kinds of TIMPs(es) are reported now and are respectively called TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3. It usually combines with an active type MMPs, and these TIMPs(es) are considered to have a physiological operation of restoration of an organization, prevention of organization destruction, cancer transition suppression, or proliferation-of-cells promotion. Moreover, TIMP-1 is combined with potential mold MMP-9, TIMP-2 are combined with potential mold MMP-2, and it is thought that activation and autolysis activity of each MMPs are controlled.

[0004]

[The technical problem which should be solved] Measurement of the active type MMPs of isolation may serve as a means to know the amount of active MMPs(es) which participates in decomposition of a matrix component directly among MMPs(es) which exist in an organization or body fluid. Therefore, it becomes possible by carrying out the fixed quantity of the active type MMPs of isolation to perform a diagnosis or monitor of symptoms like seepage of the disorder for which MMPs activity rises, for example, the arthrosis, and cancer, transition, gum disease, and the fibroid lung. However, other MMPs(es) and TIMPs(es) existed in an organization and body fluid, and since each substrate specificity of MMP was large, the judgment fixed quantity of MMPs was difficult for them, although the method by the enzyme activity into which each substrate is made to decompose was generally thought as a method of measuring the amount of active MMPs(es). Zucker et al. (PCT WO 93/20447) -- two kinds of antibodies, i.e., every, -- an antibody and every to MMP -- MMP-TIMP complex is measured using the antibody to TIMP By this method, the active type MMPs (the active type MMPs of isolation) which is in the free state in connection with decomposition of a matrix component only by measuring the already formed inactive MMP-TIMP complex directly cannot be measured. moreover, from TIMPs combining with all the active types MMPs, and TIMP-1 or TIMP-2 combining potential mold MMP-9 or potential mold MMP-2 respectively further In order to carry out the fixed quantity of the one active type MMP, you have to carry out the fixed quantity of all of the complex of TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3. Since the judgment fixed quantity of latent type MMPs and complex is furthermore needed about MMP-2 and MMP-9, it is difficult to carry out the fixed quantity of the exact amount of active MMPs(es). In this way, there is no report about the assay of the active type MMPs which is in a free state till present. Although it will be thought that an active type MMPs can be measured

if latent type MMP furthermore is not recognized but a specific antibody is used for an active type MMPs, there is also no report that such [still] an antibody was obtained.

[0005]

[Solution of a technical problem] The purpose of this invention is to offer the method of classifying each amount of active MMPs(es) that sensitivity is good, often [precision], and quickly, and carrying out a fixed quantity using easy operation and an easy reagent. It is also one of the purposes of this invention to offer the reagent kit used for such a method. The inhibitor which combines this invention persons with an active type MMPs, and suppresses the activity, For example, the inside of TIMPs, an alpha2-macroglobulin, a peptide inhibitor, a synthetic compound, etc., It notes that TIMPs combines with the active type of all MMPs(es) specifically. The antibody which considers that can offer the judgment assay of the active type MMPs of simple isolation with the combination of the antibody and TIMPs which are combined specifically to each MMP, and is wholeheartedly combined with it specifically at each MMP as a result of research, The judgment assay of the active type MMPs of the isolation used for TIMPs or TIMPs, and each TIMP combining a composite with the antibody combined specifically was established. When TIMPs was furthermore used as an object for indicator grant, the judgment assay of the active type MMPs of simple isolation was established by succeeding in giving an indicator object directly or indirectly, without losing the binding affinity to the active type MMPs of TIMPs, and combining the antibody combined specifically with TIMPs which gave this indicator object, and each MMP. When using combining the antibody specifically combined with TIMP-1 which gave especially the direct indicator object, and each MMP, The fixed quantity of active MMP-1 of isolation, -2, -3, -7, -8, -10, -11, -12, -13, and -14 can be carried out. TIMP-2 which gave the direct indicator object, and every -- when using for MMP combining the antibody combined specifically, the fixed quantity of active MMP-1 of isolation, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, and -14 can be carried out As well as the above when using TIMP-1 or TIMP-2 for solid phase furthermore, the fixed quantity of the active type MMPs of each isolation can be carried out.

[0006] furthermore, every -- the antibody specifically combined with MMP, and every -- every which gave the indicator object indirectly using the anti-TIMP antibody which gave the indicator object when using combining TIMP -- by using TIMP The fixed quantity of the active type MMPs of all isolation, MMP-1 [i.e., ], -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, and -14 can be carried out. what was chosen from the group to which this invention changes from TIMPs, and every -- it is in offering the reagent which uses combining what was chosen from the group which consists of the monoclonal antibody to MMP, uses one side of the combination component as the component which gave a direct or indirectly detectable indicator object, uses as a component which solid-phase-ized other combination components, and uses for the method of carrying out the judgment fixed quantity of the active type MMPs of isolation in a specimen, and its method in this way, TIMPs (every -- TIMPs which gave the indicator object indirectly by each monoclonal antibody which gave the indicator object to TIMP is included) which gave the indicator object of the above [the purpose of this invention] typically, or every -- as the monoclonal antibody to MMP, and the object for solid phase support -- every -- it is in offering the outstanding method of carrying out the judgment fixed quantity of the active type MMPs of isolation in a specimen, and the reagent kit for it using the monoclonal antibody or TIMPs to MMP It is understood that this invention contains the whole of each reagent of the reagent kits which can carry out the judgment fixed quantity of the active type MMPs of such isolation in the inside of the embodiment. Furthermore, the purpose of this invention is by carrying out the judgment fixed quantity of the active type MMPs of isolation using the above-mentioned assay to offer the method and reagent, or diagnostic agent which can act as the monitor of the symptoms, such as organization destruction and cancer transition. therefore, the thing for which the above-mentioned reagent is used as an index of a physiological operation of various use of the above-mentioned reagent in a medical physiological field, organization destruction and cancer transition, judgment of the grade of restoration of an organization, or proliferation-of-cells promotion -- all -- the operative condition of this invention -- it is understood that it contains while like

[0007] According to the mode according to this invention, the following assay is offered, for example.

(1) TIMPs to which the indicator object was given, and every -- TIMPs by which the indicator object was given to the monoclonal antibody or (2) TIMP specifically combined with MMP through the monoclonal antibody combined specifically, and every -- the reagent which uses for the assay of the active type MMPs of isolation and it which is characterized by making each active type MMP into the standard substance by to perform the judgment fixed quantity of the active type MMP of each isolation in a specimen, using respectively the monoclonal antibody specifically combined with MMP In the assay of this invention, the monoclonal antibody specifically combined with MMP used is specifically combined with each MMP, it is the monoclonal antibody which does not carry out a cross reaction to another MMPs, and what recognizes each central field of MMP or a carboxyl-terminus field especially is mentioned.

[0008] The inhibitor to MMPs used by this invention may contain the inhibitor to MMPs of the MMP gene familiar origin, for example, can be an inhibitor to MMPs(es), such as TIMP-1 and TIMP-2. Although TIMP-1 was called collagenase inhibitor since it checked beginning MMP-1, since it also checks a gelatinase and a strike ROM lysin after that, it is what came to be called TIMP, and checks widely the collagenase from which the origin from a tadpole to Homo sapiens differs. TIMP-1 Many explantation organizations, for example, an aorta, a cartilage, fetal bones, An epithelium, cultured cells, for example, fiber buds, such as a tendon, a tooth pulp, gum, a synovial membrane, and a uterus Cells, such as an inner bark, \*\*\*\*, a cartilage, and a smooth muscle, a platelet, a monocyte, a macrophage, Being produced by the tumor cell etc. is admitted. A tooth-pulp origin cell, from a Homo sapiens placenta etc. -- it can obtain -- for example, Kodama et al. and Collagen Rel. A method given in 404 and 1984 is followed. Res. and 7,341- 350, 1987, and J.Biochem.96,395- the non-eruption of teeth of a cow -- isolating from the culture medium of a cow tooth-pulp origin cell called the root tooth pulp of wisdom teeth \*\*\*\* -- Kodama

etal., J.Immunol.Methods, and 127,103- according to the method of a publication, it can obtain from a Homo sapiens placenta etc. to 108 and 1990

[0009] It is known that, as for TIMP-2, the content amino acid sequence has the part which has TIMP-1 and a homology. TIMP-2 -- from a mouse colon cancer cell, for example, colon26 cell, a Homo sapiens placenta, etc. -- it can obtain -- for example, Fujimoto et al., Clin.Chim.Acta, 220, and 31- according to the method of a publication, it can obtain from a Homo sapiens placenta etc. to 45, 1993, JP,6-300757,A, etc. TIMP-1 and TIMP-2 -- transgenic technology -- it can also obtain -- for example, Williamson et al., Biochem.J., and 268,267- 274, 1990, and Boone et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87, and 2800- it can obtain by carrying out the method of a publication to reference 2804 and 1990 These TIMPs(es) can be used after refining conventionally by the gel-filtration method by salting-outs, such as a well-known method, for example, ammonium sulfate precipitation etc., sephadex, etc., an ion-exchange-chromatography method, an electrophoresis method, dialysis, the ultrafiltration, the affinity chromatography method, the high-performance-chromatography method, etc. Although what is an inhibitor to MMPs fundamentally can be used without being limited, a thing combinable specifically [ it is desirable and ] to an active type MMPs is mentioned.

[0010] The monoclonal antibody used by this invention cannot be overemphasized by that you may be the monoclonal antibody obtained using the cytogamy technique using the myeloma cell indicated by Keller, Milstein (Kohler, G. & Milstein, C.) (497 Nature, 256,495- 1975), etc. The monoclonal antibody used by this invention is producible at the following processes.

1. Selection of Cell Fusion 5. Hybridoma (Syncytium) of Manufacture 4. Antibody Forming Cell of Immunity 3. Myeloma Cell (Myeloma Cell) of Animal and Myeloma Cell by Manufacture 2. Immunogenicity Antigen of Immunogenicity Antigen, and Manufacture of Monoclonal Antibody [0011] 1. As a Manufacture Antigen of Immunogenicity Antigen for example, Kodama et al. and CollagenRel. Res. and 7,341- 350, 1987, and Kodama et al., J.Immunol.Methods, and 127,103- by the method of a publication to 108 and 1990 TIMP-1 and Fujimoto which were prepared et al., Clin.Chim.Acta, 220, and 31- by the method of a publication to 45 and 1993 TIMP-2 prepared, recon BINANTO TIMP-1 which were prepared according to the method of a publication to JP,5-199868,A (rTIMP-1), Aoki et al., Connective Tissue 1994, in Recon BINANTO TIMP-2 (rTIMP-2) prepared according to the method of a publication to press can be used. Here, if it is TIMPs which checks MMPs activity, it can be used by every TIMPs.

[0012] moreover, as an antigen for example, Zhang et al., Clin.Chim.Acta, 219, and 1- MMP-1 and Fujimoto which were prepared according to the method of a publication to 14 and 1993 et al., Clin.Chim.Acta, 221, and 91- MMP-2 prepared according to the method of a publication to 103 and 1993 -- Okada et al., Biochem.J., and 254,731- MMP-3 and Knauper which were prepared according to the method of a publication to 741 and 1988 et al., Biol.Chem.Hoppe-Seyler., and 371,295- by the method of a publication to 304 and 1990 MMP-8, Okada which were prepared et al., J.Biol.Chem., 267, 21712- MMP-9 and Park which were prepared according to the method of a publication to 21719 and 1992 et al., J.Biol.Chem., 266, and 1584- recon BINANTO MMP-10 prepared according to the method of a publication to 1590 and 1991 -- Pei et al., J.Biol.Chem., 269, and 25849- recon BINANTO MMP-11 and Shapiro which were prepared according to the method of a publication to 25855 and 1994 et al., J.Biol.Chem., 268, and 23824-23829 -- MMP-12 prepared according to the method of a publication to 1993 And recon BINANTO MMP-12 and Freije et al., J.Biol.Chem., 269, and 16766- by recon BINANTO MMP-13 prepared according to the method of a publication to 16773 and 1994, MMP-14 which were prepared [ Japanese Patent Application No. / No. 331305 / six to ] / according to the method of a publication MMPs prepared according to the method of a publication in those reference or the reference quoted there, MMPs further obtained by transgenics etc. can be used.

[0013] Here, the thing of a latent type or an active type can use it preferably. Conventionally, such an antigen can be refined by the gel-filtration method by salting-outs, such as a well-known method, for example, ammonium sulfate precipitation etc., sephadex, etc., an ion-exchange-chromatography method, an electrophoresis method, dialysis, the ultrafiltration, the affinity chromatography method, the high-performance-chromatography method, etc., and can be obtained from antigen production material, such as transformant cells, such as various raw materials, for example, a cultured cell, and a cultivation organization. Refining separation processing can be processed and carried out in the affinity chromatography which fixed preferably the bottom of fixation of the antibody or inhibitor which recognizes antigens, such as polyacrylamide electrophoresis and a monoclonal antibody, specifically. Gelatin-agarose affinity chromatography, a heparin-agarose chromatography, etc. are mentioned especially preferably.

[0014] In this way, although the obtained antigen is still better as for immunogenic conjugate etc., it can be used for mixing with an adjuvant suitable as it is, and carrying out immunity of the animal. Furthermore, an antigen can combine with various carrier protein what fragmented it through a suitable condensing agent, can be made into the immunogenic conjugate like hapten-protein, and can also be used for designing the monoclonal antibody which can recognize only a specific array using this. for example, Boone et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87, and 2800- using the polypeptide which designed the polypeptide with the amino acid sequence predicted from the cDNA array of Homo sapiens TIMP-2 of a publication to 2804 and 1990, compounded to them, and was obtained is mentioned A cysteine residue etc. is beforehand added to the polypeptide designed, and it can enable it to be able to make manufacture of immunogenic conjugate easy. In making it combine with carrier protein, carrier protein is activable first. Introducing an activation joint machine in such activation is mentioned.

[0015] As an activation joint machine, (2) activation dithio, for example, 2-pyridyl dithio etc., such as (1) activation ester or an activation carboxyl group, for example, a nitrophenyl ester machine, a pentafluorophenyl ester machine, 1-benzotriazol

ester machine, and N-succinimide ester machine, is mentioned. As carrier protein, polypeptide, such as keyhole limpet hemocyanin (KLH), a cow serum albumin (BSA), an ovalbumin, a globulin, and the poly-lysine, and a bacteria biomass component, for example, BCG etc., are mentioned.

[0016] 2. for carrying out immunity of the immune animal of the animal by the immunogenicity antigen -- for example, editing besides the Muramatsu \*\*\*\*, the experiment biology lecture 14, immunobiology, Maruzen Co., Ltd., Showa 60, the edited by Japanese Biochemical Society, the \*\*\*\*\* experiment lecture 5, an immunobiochemistry approach, Tokyo Kagaku Dojin, 1986, the edited by Japanese Biochemical Society, the new chemistry experiment lecture 12, and molecule immunology It can carry out in III, an antigen, an antibody and a complement, Tokyo Kagaku Dojin, 1992, etc. according to the method of a publication. As an adjuvant used with an antigen, the Freund's complete adjuvant, the Ribi (Ribi) adjuvant, a pertussis vaccine, BCG, Lipid A, a liposome, an aluminum hydroxide, a silica, etc. are mentioned, for example. Immunity is performed using animals including mice, such as BALB/c. To a mouse, the dose of an antigen is about 1-400microg / animal, generally the inside of the peritoneal cavity of a host animal and hypodermically are injected with it, and henceforth, preferably, in peritoneal cavity, it repeats a booster about 2 to 10 times, and performs it in hypodermically, a vein, or muscles, every one - two weeks every one - four weeks. As a mouse for immunity, F1 mouse of an others and BALB/c system mouse and an other-system mouse etc. can also be used. [ mouse / BALB/c system ] If needed, antibody titer system of measurement is prepared, antibody titer is measured, and the grade of animal immunity can be checked.

[0017] 3. It Can Choose out of Cell Strain Which Does Not Produce Immunoglobulin as an Unlimited Proliferation Possible Stock (Tumor-Cell Stock) Used for Manufacture Cell Fusion of Myeloma Cell (Myeloma Cell). For example, P3-NS-1-Ag 4-1 (NS-1, Eur.J.Immunology, 6, 519 [ 511-519 ], 1976), SP2 / 0-Ag14 (SP2, Nature276, 270 [ 269-270 ], and 1978), P3-X63-Ag8-U1 of the mouse myeloma MOPC-21 cellular in origin (P3U1, Current topics in Microbiol.and Immunol., 81, 1-7, and 1978), P3-X63-Ag8 (X63, Nature256, 497 [ 495-497 ], and 1975) and P3-X63-Ag 8-653 (653, J.Immunol., 123, 1550 [ 1548-1550 ], 1979) etc. -- it can use Although the passage of the mouse myeloma cell strain of 8-azaguanine resistance is carried out by the culture medium which added antibiotics, such as penicillin and amikacin, fetal calf serum (FCS), etc. to cell culture media, such as the Dulbecco MEM culture medium (DMEM culture medium) and RPMI-1640 culture medium, and added 8-azaguanine (for example, 5-45microg/(ml)) to them further, two - five days before cell fusion, the passage of it can be carried out by the normal culture medium, and it can prepare the cell strain of a required number. Moreover, after a use cell strain thaws a cryopreservation stock completely at about 37 degrees C, it may be cultivated by the normal culture medium after 3 times or more washing by normal culture media, such as RPMI-1640 culture medium, and may prepare the cell strain of a required number.

[0018] 4. The spleen is extracted after (the last immunity and two - five days), and the animal by which immunity was carried out according to the process of cell fusion above-mentioned 2. of an antibody forming cell and a myeloma cell, for example, a mouse, obtains splenic-cells suspension. The lymphonodus cell of living body every place besides splenic cells can be obtained, and it can also be used for cell fusion. In this way, the myeloma cell strain which might be followed by the process of the obtained splenic-cells suspension and above-mentioned 4. is placed into cell culture media, such as a MEM (MEM culture medium), a DMEM culture medium, and RPMI-1640 culture medium, and a cell fusion agent, for example, a polyethylene glycol, is added. As a cell fusion agent, what was known for these various fields of these in addition to this can be used, and the Sendai virus (HVJ:Hemagglutinating virus of Japan) inactivated as such a thing is mentioned. Preferably, 0.5-2ml of 30 - 60% of polyethylene glycols can be added, molecular weight can use the polyethylene glycol of 1,000-8,000, further, molecular weight is more desirable and the polyethylene glycol of 1,000-4,000 can use it. As for the concentration of the polyethylene glycol in the inside of a fusion culture medium, it is desirable to make it become 30 - 60%. If needed, dimethyl sulfoxide etc. can be added a little and fusion can also be promoted. The splenic cells used for fusion (lymphocyte): The rate of a myeloma cell strain can be more preferably set to 4:1-7:1, although being referred to as 1:1-20:1 is mentioned. A fusion reaction is performed for 1 - 10 minutes, and, next, cell culture media, such as RPMI-1640 culture medium, are added. Fusion reaction processing can also be performed two or more times. It moves to the culture medium for post selection which separated the cell by centrifugal etc. after fusion reaction processing.

[0019] 5. As selection of a hybridoma (syncytium), and a culture medium for monoclonal selection, culture media, such as a FCS content MEM culture medium which contains a hypoxanthine, an aminopterin, and thymidine, for example, and RPMI-1640 culture medium, and the so-called HAT medium are mentioned. Generally, although the method of selective-medium exchange can be carried out as the capacity and this capacity which were poured distributively on the cultivation plate are applied on the next day and it exchanges for day by day [ 1 - 3 ] a moiety every by the HAT medium after that, suitably, it can add change to this and can also perform it to it. Moreover, culture-medium exchange can be carried out to day by day [ 1 - 4 ] by the so-called HT culture medium except the aminopterin after fusion on eight - the 16th. As a feeder, for example, a mouse thymus cell can also be used and it may be desirable. Use each TIMP, each Homo sapiens MMP antigen, or its fragment peptide for the culture supernatant of the prosperous cultivation well of proliferation of a hybridoma as an antigen with system of measurement, such as for example, radiation immunity analysis (radioimmunoassay), ELISA, and fluorescence immunity analysis (FIA), or fluorescence inducement cellular segregation equipment (FACS), or using an indicator anti-mouse antibody, measure the purpose antibody, and it screens, or dissociates. Cloning of the hybridoma which is producing the purpose antibody is carried out. Cloning carries out picking up of the colony in an agar medium, or it is made by limiting dilution and it deals in it. It can carry out more preferably by limiting dilution. As for cloning, it is desirable to carry out two or more times.

[0020] 6. the manufacture profit \*\*\*\* hybridoma stock of a monoclonal antibody can be cultivated in suitable culture media for proliferation, such as a FCS content MEM culture medium and RPMI-1640 culture medium, and can obtain a desired monoclonal antibody from the culture-medium supernatant liquid. In order to obtain a lot of antibodies, ascites-izing a hybridoma is mentioned. In this case, each hybridoma is transplanted in the peritoneal cavity of the animal of the myeloma cell origin, and an affiliated histocompatibility animal, each hybridoma is transplanted to a nude mouse etc., it can be proliferated [ it can be made to be able to increase, or ], and the monoclonal antibody produced in the ascites of this animal can be collected and obtained. What is necessary is to proliferate a hybridoma and just to extract ascites, after injecting intraperitoneally straight mineral oil, such as a pristane (2, 6, 10, 14-tetramethyl pentadecane), in advance of the transplant of a hybridoma. Ascites liquid can be refined by the gel-filtration method by salting-outs, such as a method remaining as it is or conventionally well-known, for example, ammonium sulfate precipitation etc., sephadex, etc., an ion-exchange-chromatography method, an electrophoresis method, dialysis, the ultrafiltration, the affinity chromatography method, the high-performance-chromatography method, etc., and can be used as a monoclonal antibody. Preferably, after carrying out ammonium sulfate fractionation of the ascites containing a monoclonal antibody, in the affinity column like the anion-exchange gel like DEAE-sepharose, and a protein A column etc., it is processed and can carry out refining separation processing. The affinity chromatography which fixed especially an antigen or antigen fragments (for example, part which a synthetic peptide, recombination antigen protein or a peptide, and an antibody recognize specifically) preferably, the affinity chromatography which fixed protein A are mentioned.

[0021] In this way, the obtained monoclonal antibody can be investigated using a commercial isotype specific anti-mouse immunoglobulin antibody, for example, an isotype specific rabbit anti-mouse immunoglobulin antibody etc., about the type of the heavy chain of the antibody composition chain, and a light chain. A monoclonal antibody Moreover, the thing prepared by the method JP,6-300757,A and given in Clin.Chim.Acta (14 J. Zhang et al., 219, 1- 1993), For example, the monoclonal antibody given [ this ] in reference from clone 78-12G8 (fine \*\*\*\* trust number FERM P-13115), What was prepared by the method JP,6-213888,A and given in Clin.Chim.Acta (103 N. Fujimoto et al., 221, 91- 1993), For example, the monoclonal antibody given [ this ] in reference from clone 75-7F7 (fine \*\*\*\* trust number FERM P-13335), What was prepared by the method given in Clin.Chim.Acta (88 N. Fujimoto et al., 231, 79- 1994), For example, it can be a monoclonal antibody from the clone 73-18B3 (fine \*\*\*\* trust number FERM P-13695) given [ this ] in reference etc. this every -- the monoclonal antibody specifically combined to MMP -- every -- what recognizes the latent type and active type of MMP is mentioned as a desirable thing

[0022] Moreover, it is also possible to produce an antibody with gene modification technology using the base sequence which carries out the code of the antibody which determined the array of the antibody obtained in large quantities in this way, or was obtained from the hybridoma stock. Fab, Fab', and F(ab')<sub>2</sub> which are obtained by processing these antibodies with enzymes, such as a trypsin, a papain, and a pepsin, furthermore, and returning by the case You may use it by making it the said antibody fragment. These fragmentation can be refined by methods, such as CM- or a DEAE cellulose chromatography, gel filtration, and affinity chromatography. As an antibody which gives an indicator object, an IgG fraction and specific bond-part Fab' obtained by carrying out pepsin digestion post reduction further can be used. As an example of the indicator object in these cases, there is enzymes (a peroxidase, alkaline phosphatase, or beta-D-galactosidase), a chemical, a fluorescent substance, or radioisotope so that the following may be carried out.

[0023] every obtained in this way in this invention -- it uses combining the monoclonal antibody and TIMPs which are specifically combined to MMP, and the method of classifying immunologically each active type MMP of isolation in a sample sample, and carrying out a fixed quantity is offered every obtained further in this way -- the monoclonal antibody specifically combined to MMP, TIMPs, or every -- it uses combining TIMPs which combined the monoclonal antibody specifically combined to TIMP, and the method of classifying immunologically each active type MMP of isolation in a sample sample, and carrying out a fixed quantity is offered As a monoclonal antibody which recognizes especially each TIMP specifically, the monoclonal antibody which recognizes TIMP-1 specifically, and the monoclonal antibody which recognizes TIMP-2 specifically are mentioned. although it prepares according to the publication of JP,5-244985,A and the obtained antibody is mentioned -- among those, the strong mouse of compatibility with high and singularity -- anti- -- TIMP-2 IgG (clone 67-4 H 11, fine \*\*\*\* trust number FERM P-12690) or it, the thing that has the same singularity substantially are mentioned. every -- as the monoclonal antibody which recognizes MMP specifically -- every -- the monoclonal antibody of MMP which recognizes an active type at least uses -- having -- every -- the monoclonal antibody which recognizes the central field of MMP specifically, and every -- the monoclonal antibody which recognizes the carboxyl-terminus field of MMP is mentioned The monoclonal antibody which has recognized each TIMP and each TIMP specifically, and was labeled may be mutually combined before the reaction with an active type MMPs. The crosslinking bond of the combination etc. is comparatively stable, and the method which does not influence comparatively is mentioned to the reactivity over each MMP of each TIMP. the case where it is in a stronger joint gestalt -- a latent type -- MMP-2 or a latent type -- the reaction of MMP-9 -- setting -- every -- TIMP and every -- there is no problem of the maceration between the monoclonal antibodies which have recognized TIMP specifically and were labeled etc., and it is more desirable The combination can be suitably chosen from the method applied to the above-mentioned immunogenic conjugate, the method of using for the following labeling, the method of using for solid phase-ization, etc., and can be used. Although the method of using aldehydes, such as formaldehyde, as a cross linking agent preferably is mentioned, it is not limited to this.

[0024] Furthermore by this invention, the method of classifying immunologically each active type MMP of isolation in a

sample sample, and carrying out a fixed quantity using the complex of each monoclonal antibody specifically combined to MMP, the antibody specifically combined with TIMPs, and TIMPs, is also offered. The method of classifying immunologically each active type MMP of isolation in a sample sample, and carrying out a fixed quantity, using each monoclonal antibody specifically combined to MMP as a solid phase-ized reagent, is offered preferably, using the complex of the monoclonal antibody and TIMPs which recognize specifically the monoclonal antibody which recognizes especially TIMP-1 specifically, or TIMP-2 as an indicator reagent. MMPs which sugar has combined produces variation in molecular weight with a sugar chain etc., or the measurement molecular weight reported by the researcher also differs. Therefore, in this invention, if the active type of MMP of isolation is measured substantially, especially the molecular weight will not be limited. It is common to roughly divide MMPs and it to be divided into a pro peptide (propeptide), a catalytic activity domain (catalytic domain), a hinge region (hinge region), and four fields of a pexin-like domain (pexin-like domain), and to make a pro peptide field into an amino-terminus field, to make a pexin-like domain field into a carboxy distal region, and to make a catalytic activity domain and a hinge region in the meantime into a central field.

[0025] Measurement of this invention can be performed by the immunoassay, for example, a competed type immunoassay, or the un-competing type immunoassay, a radioimmunometric assay, ELISA, etc. can be used, and the measurement can be performed without carrying out even if it performs B-F separation or. It has each TIMP by the monoclonal antibody which it could be labeled possible [ direct detection ] and labeled possible [ the detection specifically combined to each TIMP before an assay reaction ], and it may be labeled possible [ detection ] indirectly. On the other hand, each antibody to MMP is fixed in solid phase. In another mode, TIMPs can also be fixed in solid phase and each antibody to MMP may be labeled possible detection ] in this case. In order to make a sample, and Labeling TIMPs and a solid phase-ized antibody react one by one if needed, incubation processing is carried out, and an indicator object is measured after separating uncombined TIMPs here. The amount of the measured indicator is proportional to an antigen, i.e., the amount of each active type MMP. Washing, churning, shake, filtration, or preliminary extraction of an antigen is suitably adopted in these measurement process under specific circumstances. The measurement conditions of others, such as concentration of a specific reagent, the buffer solution, etc., temperature, or the incubation processing time, are changeable according to elements, such as concentration of the antigen in a sample, and a property of a sample sample. This contractor can measure by selecting the optimal effective conditions suitably to each measurement, using the usual laboratory procedure.

[0026] As support for solid-phase-izing, much support which can carry out [ solid phase ]-izing is known, and by this invention, an antigen or an antibody can be suitably chosen from them, and can be used. As support, many things are known, and what is used for an antigen-antibody reaction etc. can use it also in this invention, choosing from these well-known things, of course. As what is used especially suitably, for example Glass, for example, activation glass, A porous glass, silica gel, a silica alumina, an alumina, magnetization iron, Inorganic material, such as a magnetization alloy, polyethylene, polypropylene, a polyvinyl chloride, A polyvinylidene fluoride, polyvinyl acetate, a polymethacrylate, polystyrene, A styrene-butadiene copolymer, a polyacrylamide, a bridge formation polyacrylamide, A styrene-methacrylate copolymer, polyglycidylmethacrylate, An acrolein-ethylene glycol dimethacrylate copolymer etc., Bridge formation-ized albumin, a collagen, gelatin, a dextran, agarose, Bridge formation agarose, a cellulose, a microcrystal cellulose, a carboxymethyl cellulose, Nature, such as a cellulose acetate, or a conversion cellulose, a bridge formation dextran, What has introduced the functionality machine by the silane coupling agent etc. if needed by organic polymeric materials, such as polyamides, such as nylon, polyurethane, and the poly epoxy resin, the thing obtained by carrying out the emulsion polymerization of them further, the cell, the erythrocyte, etc. is mentioned. Furthermore, a round salient is attached to the cell which consists of synthetic material, such as the wall of a filter paper, a bead, and an examination container, for example, a test tube, a titer plate, a titer well, a glass cell, and a cell made of synthetic resin, a glass rod, the rod which consists of a synthetic material, the rod which made the end thick or was made thin, and an end, or the front face of solid matters (body), such as a rod which attached the flat salient, and To these support, each monoclonal antibody which can be made to combine an antibody and is preferably combined specifically to MMP can be combined. Combination with support and the thing which participates in these antigen-antibody reactions can be performed by the chemical method, and using what was activated, the technique of having used the mutual chemical ligation reaction further, etc. [ using physical technique, such as adsorption, or a condensing agent ]

[0027] As an indicator, an enzyme, an enzyme substrate, an enzyme inhibitor, supplementary molecules, a coenzyme, a proenzyme, an apoenzyme, a fluorescent substance, the coloring matter matter, a chemistry luminescence compound, a photogene, the coloring matter, the magnetic matter, and metal particles, for example, gold colloid etc., can mention the radioactive substance etc. The hydrolase which understands the transferring enzyme which carries out the catalyst of transferring oxidoreductases, for example, the amino group, such as a dehydrogenase, a reductase, and oxidizing enzyme, a carboxyl group, a methyl group, an acyl group, a phosphoric-acid machine, etc. as an enzyme, for example, ester combination, a glycosidic linkage, ether linkage, peptide linkage, etc. an added water part, a lyase, isomerase, a ligase, etc. can be mentioned. An enzyme is also applicable to detection, using two or more enzymes complexly. For example, enzyme-cycling can also be used.

[0028] As typical enzyme labeling, alkaline phosphatase, such as galactosidase, such as peroxidases, such as horseradish peroxidase, and Escherichia coli beta-D-galactosidase, a maleate dehydrogenase, a glucose-6-phosphate dehydrogenase, a glucose oxidase, a glucoamylase, an acetylcholineesterase, a catalase, cow small intestine alkaline phosphatase, and Escherichia coli alkaline phosphatase, etc. is mentioned. When the alkaline phosphatase is used, substrates, such as phosphorization phenol derivatives, such as umbelliferone derivatives, such as 4-methylumbelliferyl hosphate, and



nitrophenyl phosphate, an enzyme-cycling system using NADP, a luciferin derivative, and a JIOKI cetane derivative, are used, and it can measure by fluorescence, luminescence, etc. to produce. Luciferin and a luciferase system can also be used. Since it reacts with a hydrogen peroxide and oxygen is generated when a catalase is used, the oxygen is also detectable by the electrode etc. They can also be an ion electrode and a liquid-membrane type electrode using a glass electrode and slightly soluble salt membrane as an electrode, a poly membrane electrode, etc. Enzyme labeling can also be transposed to a biotin indicator object and an enzyme-labeling avidin (streptoavidin). The indicator of a kind with which plurality differed can also be used for an indicator. It can also make it possible a discontinuous target and to carry out that it is simultaneous or separately continuously [ measurement / two or more ] in such a case.

[0029] In this invention to formation of a signal 4-hydroxyphenyl acetic acid, 1, 2-phenylenediamine, A tetramethyl benzidine, etc. and horseradish peroxidase, umbelliferol galactoside, Nitrophenyl galactoside etc. and beta-D The combination of enzyme reagents, such as - galactosidase and glucose 6 phosphate dehydrogenase, can also be used. What can form thiol compounds, such as quinol compounds, such as a hydroquinone, a hydroxy benzoquinone, and hydroxy anthraquinone, a lipoic acid, and a glutathione, a phenol derivative, a ferrocene derivative, etc. by work of an enzyme etc. can be used.

[0030] As a fluorescent substance or a chemistry luminescence compound, luminol, such as rhodamine derivatives, such as a fluorescein isothiocyanate, for example, a Rhodamine B isothiocyanate, and tetramethylrhodamine isothiocyanate, a dansyl chloride, a dansyl fluoride, full ORESUSAMIN, a FIKO kinky thread protein, an acridinium salt, RUMIFERIN, a luciferase, and ECUORIN, an imidazole, an oxalate, a rare earth chelate compound, a coumarin derivative, etc. are mentioned. In order to carry out an indicator, it can carry out using the reaction of a thiol group and a maleimide machine, the reaction of a pyridyldisulfide group and a thiol group, the reaction of the amino group and an aldehyde group, etc., and it chooses suitably from the method which a well-known method or this contractor of the field concerned can make easily, and the method which embellished them further, and can apply. For example, NaIO<sub>4</sub> The used constructing-bridge method (for example, after protecting the amino group by the 1-fluoro -2, 4-dinitrobenzene, etc., it oxidizes by meta-NaIO<sub>4</sub> and consists of the method of returning by back NaBH<sub>4</sub> to which protein, such as an antibody, was made to react next) is mentioned. Moreover, the condensing agent which can be used for the above-mentioned immunogenicity complex production, the condensing agent which can be used for combination with support can be used.

[0031] As a condensing agent, for example A glutaraldehyde, hexamethylene di-isocyanate, A hexamethylene JIISO thiocyanate, N, and N'-polymethylene screw iodoacetamide, -o-phenylenedimaleimide, and para benzoquinone, N, and N', N'-ethylene bismaleimide, Ethylene glycol screw SUKUSHINIMIJIRU succinate, a screw diazo benzidine, A 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide, Succinimidyl 3-(2-pyridyl dithio) propionate (SPDP), N-succinimidyl 4-(N-maleimide methyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), N-sulfo succinimidyl 4-(N-maleimide methyl) cyclohexane-1-carboxylate, N-succinimidyl (4-iodine acetyl) Amino benzoate, N-succinimidyl 4-(1-maleimide phenyl) butyrate, N-(epsilon-MAREIMIDOKAPUROIRUOKISHI) succinimid (EMCS), An imino thio run, S-acetyl mercaptosuccinic acid anhydride (AMSA), Methyl-3-(4'-dithiopyridyl)propionimide, methyl-4-mercapto butyrylimide (MMBI), methyl-3-mercapto propionimide, N-succinimidyl-S-acetyl mercapto acetate, etc. are mentioned.

[0032] According to the measuring method of this invention, the matter which should be measured can be made to be able to react to the TIMP reagent which carried out the indicator with an antibody reagent or an enzyme etc. which carried out the indicator to TIMP or the antibody combined with support with the enzyme etc. one by one, and they can also be made to react simultaneously. The sequence of adding a reagent changes with selected molds of a support system. When beads, such as plastics by which sensitization was carried out, are used, it can measure by adding the monoclonal antibody reagent or TIMP reagent which put in together into the test tube suitable at first with the sample sample containing the matter which should measure beads, such as this plastics by which sensitization was carried out, and carried out the indicator with the enzyme etc. after that. In the assay of this invention, although immunoassay is used, as solid phase support in that case, a various material and various gestalten, such as the product made from polystyrene which adsorbs protein, such as an antibody, well, the product made from a polycarbonate, the product made from polypropylene or a ball made from a polyvinyl, a microplate, a stick, a particle, or a test tube, can be chosen arbitrarily, and can be used. It can carry out in a suitable buffer-solution system so that it may maintain at optimum pH about 4-9, for example, pH, in measurement. As a suitable buffer, an acetate buffer, a citrate buffer, a phosphate buffer, a tris buffer, a triethanolamine buffer, a borate buffer, a glycine buffer, a carbonate buffer, a tris-hydrochloric-acid buffer, etc. are mentioned especially, for example. A buffer can be mutually mixed and used at an arbitrary rate. It is desirable to perform an antibody antigen reaction at the temperature between about 0 degree C - 60 degrees C.

[0033] Although incubation processing of the TIMP reagent you were made to combine with the TIMP reagent which carried out the indicator with the antibody reagent which carried out the indicator with the enzyme etc., the enzyme, etc., the antibody reagent you were made to combine with support, and support, and the matter which should be measured further can be performed until it reaches a balance A reaction can be stopped after the incubation processing which separated solid phase and the liquid phase and was limited when much early rather than the balance of an antibody antigen reaction was attained, and the grade of the existence of indicators, such as an enzyme in either the liquid phase or solid phase, can be measured. It is possible to perform measurement operation using the automated measuring device, and the display signal which a substrate is changed in an operation of an enzyme using a luminescence detector, a phot detector, etc., and is produced can also be detected and measured.



[0034] In an antibody antigen reaction and a reaction with active types MMPs and TIMPs, a suitable means can be adopted as stabilizing indicators, such as a reagent used, respectively, matter which should be measured, and also an enzyme, or stabilizing an antibody antigen reaction and the reaction with active types MMPs and TIMPs itself. Furthermore, an un-unique reaction is removed, and since the influence which works in prevention is reduced or a measurement reaction is activated, protein, a stabilizing agent, a surface activity-ized agent, a chelating agent, etc. can also be added into an incubation solution. Blocking processing for preventing the un-specific ligation reaction which was ordinarily adopted in the field concerned or was known by this contractor may be performed, for example, it can process with normal-serum protein, such as mammalian, albumin, skim milk, the milk fermentation matter, a collagen, gelatin, etc. As long as it is the purpose which prevents an un-specific ligation reaction, especially those methods are not limited but can be used. As a sample measured by the measuring method of this invention, although a solution, the colloidal solution, etc. of all gestalten can use it, the fluid sample of the organism origin, for example, blood, plasma, a blood serum, a synovial fluid, cerebrospinal fluid, saliva, an amniotic liquid, urine, other body fluid, cell culture liquid, tissue culture liquid, organization gay JUNETO, etc. are mentioned preferably. Plasma, a blood serum, a synovial fluid, saliva, cell culture liquid, tissue culture liquid, organization gay JUNETO, etc. are mentioned especially preferably. If this invention is followed, it is applicable to a diagnosis or monitor of the above-mentioned disorder group by carrying out the fixed quantity of the active type MMPs of isolation in patients, such as the symptoms to which MMPs activity rises, for example, the arthrosis, cancer, a metastatic carcinoma, and gum disease, or animal body fluid using the assay concerning this invention.

[0035]

[Example] Although an example is given to below and this invention is explained concretely, it should be understood that various modes are contained without limiting this invention to an example.

example 1 manufacture TIMP-1 of TIMPs -- the Wuxi eruption of teeth -- the root tooth pulp of wisdom teeth was cultivated in the minimum indispensable Eagle culture medium (NISSUI PHARMACEUTICAL), and from the culture medium of a cow tooth-pulp origin cell, it applied to the column chromatography and refined for example, Kodama et al. and Collagen Rel. Res. and 7,341- according to the method of 350 and 1987, it prepared from various material Moreover, TIMP-2 are Fujimoto. et According to the method of al. (Clin.Chim.Acta, 220, 31- 45, 1993, and JP,6-300757,A), it prepared from various material. For example, it is anti-TIMP-2 monoclonal-antibody (for example, clone No.67-4H11 of the indication to JP,5-244985,A etc.) joint sepharose about the supernatant liquid which agitated the placenta in the after [ a fragment ] buffer solution, and was obtained. It applies to the chromatography of 4B column, and processes, the need is accepted, and they are ultrafiltration and the gel filtration, for example, Ultrogel,. It processed by AcA54 (LKB) etc. and refining Homo sapiens TIMP-2 were prepared.

[0036] Recon BINANTO TIMP-1 (rTIMP-1) uses an oligo (dT)-cellulose column from all the RNA fractions obtained from the Homo sapiens normal gum fibroblast (Homo sapiens Gin-1 cell) etc. Separate a poly A +mRNA fraction, make this into mold, and cDNA is prepared using reverse transcriptase. Docherty et A PCR primer is created for the array of TIMP-1cDNA known for 69, 1985, etc. to reference. al., Nature, 318, and 66- A TIMP gene is amplified by the PCR method using this PCR primer (primer TIF1:5'-ATGGCCCCCTTTGAGCCCCCTG-3' and primer TIR1:5'-CAGGATTCAGGCTATCTG-3'). The obtained DNA fragment can be included in vectors, such as Plasmids PEX and pMEMneo, and it can be made discovered in Escherichia coli, a CHO cell, etc., and can obtain. rTIMP-1 might be followed by the method given in JP,5-199868,A. By SDS-PAGE (uniform 12% gel, reduction conditions), rTIMP-1 prepared was accepted as a single band of about 30 kDa(s), and it was accepted as a single band of about 30 kDa(s) also in Western blotting (it dyes by peroxidase-labeling mouse anti-TIMP-1 monoclonal antibody). IC50 of the prevention activity to Homo sapiens fibroblast (CCD-41SK cell) origin MMP-1 of rTIMP-1 was abbreviation  $1 \times 10^{-9}M$ .

[0037] Recon BINANTO TIMP-2 [ moreover, ] (rTIMP-2) A poly A +mRNA fraction is separated from all the RNA fractions obtained from Homo sapiens Gin-1 cell etc. using an oligo (dT)-cellulose column. Make this into mold, make Oligo dT (15-18 pieces) into a primer, and cDNA is prepared using reverse transcriptase. Boone et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87, and 2800- the array of TIMP-2cDNA known for 2804, 1990, etc. was created to reference -- primer T2F7;AAAGTCGACCATGGGCGCCGCGGCCGACCCCT And TIMP-2 gene is amplified by the PCR method using primer T2R5;TTAAGATCTGTCGACTTAAGGATCCTCGATATCGAGGAATTCTTGC. The obtained DNA fragment can be included in vectors, such as Plasmid pKG, and it can be made discovered in a CHO cell etc., and can obtain. rTIMP-2 were prepared according to Aoki's and others (Connective Tissue, 1994, in press) method. Anti-TIMP-2 monoclonal-antibody joint sepharose It applied to the chromatography of 4B column, processed, and processed by ultrafiltration, the gel filtration, etc. if needed, and refining rTIMP-2 were prepared. rTIMP-2 prepared were accepted as a single band of about 24 kDa(s) by SDS-PAGE (uniform 12% gel, reduction conditions), and they were accepted in the position of the same molecular weight as natural mold TIMP-2 prepared from the placenta. As a result of performing Western blotting by the anti-Homo sapiens TIMP-2 monoclonal antibody (JP,5-244985,A) from which an epitope differs, it accepted to the position of about 24 kDa(s) as a single band. IC50 of the prevention activity to CCD-41SK cell origin MMP-1 was abbreviation  $1.1 \times 10^{-9}M$ . Moreover, it was suggested as a result of an amino terminus and C terminus structural analysis that rTIMP-2 obtained are the same matter as natural mold TIMP-2. Here, although it could be used by any TIMPs(es) when it was TIMPs which checks MMPs activity, rTIMPs created artificially was used.

[0038] Example 2 Although it is used in order to avoid that radioisotope, a low-molecular chemical, or a low-molecular fluorescent substance spoils the activity which protein itself has as the manufacture usual of Indicator TIMPs, and a proteinic

indicator object, here shows the method in which a possibility of spoiling activity of protein own [ the ] to TIMP generally carries out an indicator with the enzyme of a high macromolecule.

(a) Manufacture rTIMP-1 of the manufacture 1 sulfhydryl-group indicator rTIMP of rTIMPs- or IgG-peroxidase (HRP) complex or the sulfhydryl group indicator IgG, rTIMP-2, or IgG was dialyzed to the 0.1M phosphate buffer solution (pH 6.5), AMSA of a mol was added as a dimethylformamide solution 100 times to each rTIMP contained in 1ml of the solution, and the incubation of the 30 degrees C was carried out for 30 minutes. Next, 100micro (pH 7.0) of 0.1M tris-hydrochloric-acid buffer-solution (pH 7.0) 100microl, 0.1M ethylenediaminetetraacetic acid salt (EDTA, pH 6.0) 10microl, and 1M hydroxylamine solutions 1 was added, for 30 degrees C and 5 minutes, gel filtration was carried out after gentle placement by the sephadex G-25 which equilibrated by the 0.1M phosphate buffer solution (pH 6.0), and sulfhydryl group indicator rTIMP-1, SH indicator rTIMP-2, or the sulfhydryl group indicator IgG was obtained, respectively.

[0039] 2) The manufacture HRP of the maleimide indicator HRP is dissolved in 0.1M phosphate buffer solution (pH 7.0) so that it may become the concentration of 12mg/ml, EMCS of an amount was added as a dimethylformamide solution 25 times to the amount of HRP, and 30 degrees C was made to react for 30 minutes. The gel filtration was carried out by the sephadex G-25 which equilibrated this reaction mixture by the 0.1M phosphate buffer solution (pH 6.0), and the maleimide indicator HRP fraction was isolated preparatively.

[0040] 3) sulfhydryl group indicator rTIMP-1, sulfhydryl group indicator rTIMP-2, or the sulfhydryl group indicator IgG prepared by the manufacture above 1 of rTIMP-HRP or IgG-HRP complex the maleimide indicator HRP obtained by one mol by the above 2 -- three mols of each, and three mols -- or in addition, 4-degree C five mols were put for 24 hours Ultrogel which equilibrated these mixed liquor by the 0.1M tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 7.0) or the 0.1M phosphate buffer solution (pH 7.0) AcA Gel filtration was carried out in 44 columns, and rTIMP-1-HRP, rTIMP-2-HRP, or the IgG-HRP complex fraction was isolated preparatively, respectively. HRP activity was investigated for the grade of the indicator of HRP with the colorimetric method against the index about indicator rTIMP-1 obtained and indicator rTIMP-2. Although it was confirmed by making the amount of the maleimide indicator HRP obtained by the above 2 made to react increase that the amount of Combination HRP increases, it is rTIMP-1 or rTIMP-2. HRP judged respectively that it was more desirable as a reagent used for measurement of the following [ thing / which was combined 1.6 times / 1.8 or ] per mol.

[0041] (b) In case the indicator of the manufacture rTIMP of rTIMP-IgG-HRP is carried out by HRP, the indicator of the rTIMP can be indirectly carried out to rTIMP by HRP through the matter combined specifically. The monoclonal antibody specifically combined with TIMP as matter specifically combined with rTIMP here was used. The monoclonal antibody prepared considering man TIMP-2 polypeptide or natural mold TIMP-2 as an immunogen can be used. Boone et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87, and 2800- the amino acid sequence predicted by 2804 and 1990 from cDNA of a publication to three sorts of polypeptides -- For example, P-1;DSGNDIYGNPIKRIQC, P-2;DTLSTTQKKSLSLHRYQQC, and P-3;YRGAAPPKQEFLDIEDC are compounded. Immunity of the mouse can be carried out by making these into an immunogen, the maleimide indicator HRP can be made to be able to react using the monoclonal antibody obtained from the hybridoma clone created by the cell fusion method using \*\*\*\*\* from an immunity mouse, and anti-TIMP-2 monoclonal-antibody-HRP can be obtained. The antibody which can check that potential mold MMP-2 combine with TIMP-2 as such an antibody is used preferably. The antibody which recognizes the carboxyl-terminus field of TIMP-2 can be used.

[0042] in this way, the strong mouse of compatibility with singularity high among the antibodies which prepared the monoclonal antibody to the polypeptide of the carboxyl-terminus field of TIMP-2 according to the publication of JP,5-244985,A, and were obtained and -- anti- -- TIMP-2 IgG (clone 67-4 H 11, fine \*\*\*\* trust number FERM P-12690) was chosen, and the indicator of the HRP was carried out according to the term publication (aforementioned [ a ]) using it. It is rTIMP-2 to this IgG-HRP (100microg) solution. 20microg was added and 10 degrees C was made to carry out a gentle placement reaction for 3 hours. Formaldehyde was added so that it might become the 4% of the last concentration further at this mixed liquor (fixed reaction), and it was made to react at a room temperature for 2 hours. it was used -- anti- -- TIMP-2 the antibody IgG (clone 67-4H11) recognizes the carboxy distal region of TIMP-2 to be -- it is -- a latent type -- MMP-2 -- TIMP-2- anti- -- TIMP-2 It turns out that combination of IgG is dissociated (45 N. Fujimoto et al., Clin.Chim.Acta, 220, 31-1993).

[0043] The above-mentioned fixed reaction was for making it the formed immune complex (rTIMP-2-IgG-HRP) not dissociate by potential mold MMP-2, and as a result of performing a room temperature and a 0.5 - 6-hour reaction, 2 hours of reactions were the best conditions. Formaldehyde was removed by sephadex G-25 after the fixed reaction. This complex was not dissociated by potential mold MMP-2, but it checked that rTIMP-2 and IgG were being fixed. rTIMP-2-IgG-HRP prepared from this -- the latent type of rTIMP-2 -- the joint field of MMP-2 -- anti- -- TIMP-2 since it was blocked by IgG -- a latent type -- not reacting with MMP-2 was shown That is, the above-mentioned rTIMP-2-IgG-HRP reacted with all the active types MMPs, and enabled judgment of potential mold MMP-2 and active MMP-2 further. rTIMP-2 were replaced with rTIMP-1 and rTIMP-1-IgG-HRP has also been prepared by the same method as the above. Anti-man TIMP-1 monoclonal antibody carries out immunity of the mouse by making into an immunogen refining TIMP-1 obtained by carrying out like an example 1, and is obtained from the hybridoma clone created by the cell fusion method using \*\*\*\*\* from an immunity mouse. Kodama et al. and Collagen Rel. the mouse of Res., 7,341-350, and 1987 publications -- anti- -- TIMP-1 It is used choosing out of IgG.

[0044] Example 3 The selection anti-man MMP-1 monoclonal antibody of a monoclonal antibody carries out immunity of the mouse by making man pro MMP-1 into an immunogen, and is obtained from the hybridoma clone created by the cell fusion

method using \*\*\*\*\* from an immunity mouse. Refining man pro MMP-1 cultivates man normalcy skin fiber blast cell CCD-41SK (ATCC No. CRL1505) in 10% FCS content minimum indispensable Eagle culture medium. From the cell culture supernatant liquid obtained by carrying out a cell stimulus by interleukin 1 alpha if needed Concentration by ultrafiltration (Oriental filter paper UP-76), heparin sepharose CL-6B column (Pharmacia Fine Chemicals), Sephacryl - S-200 (Pharmacia Fine Chemicals), green A It applied to the chromatography by the acouchi gel-ALD column (Sterogene) etc., and refined. The antibody which recognizes active MMP-1 at least among the obtained anti-man MMP-1 monoclonal antibodies can be used. The anti-man MMP-1 monoclonal antibody chose the antibody from clone 78-12G8 (fine \*\*\*\* trust number FERM P-13115) among the monoclonal antibodies of JP,6-300757,A and Clin.Chim.Acta, 219, 1-14, and 1993 publications. This antibody recognizes a latent type and active MMP-1, and has the property in which change of the immunoreaction nature is not accepted, depending on chelating agents, such as EDTA.

[0045] the gelatin agarose from the cell culture supernatant liquid which the anti-Homo sapiens MMP-2 monoclonal antibody processed the CCD-41SK cell like the case of Homo sapiens pro MMP-1, and was obtained -- anti- -- TIMP-2 Immunity of the mouse is carried out by making into an immunogen Homo sapiens pro MMP-2 which are missing from a chromatography with IgG joint sepharose, anti-fibronectin IgG joint sepharose, etc., and are refined, and it is obtained from the hybridoma clone created by the cell fusion method using the splenic cells from an immunity The antibody which recognizes active MMP-2 at least among the obtained anti-Homo sapiens MMP-2 monoclonal antibodies can be used. anti-Homo sapiens MMP-2 monoclonal antibody -- JP,6-213888,A and Fujimoto et al., Clin.Chim.Acta, 221, and 91- the antibody from clone 75-7F7 [ strong ] (fine \*\*\*\* trust number FERM P-13335) of compatibility was used for 103 and 1993 among the monoclonal antibodies of a publication This antibody is an antibody which recognizes the carboxyl-terminus field of MMP-2 and recognizes a latent type and active MMP-2.

[0046] Anti-Homo sapiens MMP-7 monoclonal antibody from the culture medium of Homo sapiens rectal cancer cell origin CaR-1 cell J. -- Biol.Chem., 261, and 14245- 14255, 1986 and J.Biol.Chem., 267, and 21712- Okada given in 21719 and 1992 et Homo sapiens MMP-7 refined according to the method of al. Furthermore, they are a DEAE cellulose column and Green. A Dyematrixgel (product made from Amicon) column, It processes in a zinc chelate sepharose (product made from Pharmacia) column, URUTOROGERU Aca44 (product made from IBF Biotechnics) column, etc. Immunity of the BALB/c female mouse is carried out using Homo sapiens pro MMP-7 obtained as an antigen. In this way, the cell fusion of the spleen cell extracted from the mouse by which immunity was carried out is carried out to the 8-azaguanine resistance myeloma cell SP 2 (SP2 / 0-Ag14), a hybridoma is chosen, cloning is carried out, and it is obtained. Clone 125-20H11 (\*\*\*\*\* trust number FERM P-14735) are an antibody which recognizes active MMP-7 among anti-Homo sapiens MMP-7 monoclonal antibodies.

[0047] Anti-man MMP-9 monoclonal antibody cultivates a man fiber sarcomata cell (HT-1080 cell). The need is accepted and it is tumor. necrosis From the cell culture supernatant liquid obtained by carrying out a cell stimulus by factor-alpha Ultrafiltration, gelatin agarose column, and anti-TIMP-1 monoclonal-antibody joint sepharose 4B, Immunity of the mouse is carried out by making into an immunogen man pro MMP-9 which were missing from the chromatography with anti-fibronectin antibody joint sepharose 4B etc., refined, and were obtained, and it is obtained from the hybridoma clone created by the cell fusion method using \*\*\*\*\* from an immunity mouse. The antibody which recognizes active MMP-9 at least among the obtained anti-man MMP-9 monoclonal antibodies can be used. anti-man MMP-9 monoclonal antibody -- Fujimoto et al., Clin.Chim.Acta, 231, and 79- it decided to use the antibody from the strong clone 73-18B3 (fine \*\*\*\* trust number FERM P-13695) of compatibility for 88 and 1994 among the monoclonal antibodies of a publication This antibody is an antibody which recognizes the central field of MMP-9 and recognizes a latent type and active MMP-9. Each monoclonal antibody to MMP-3, -8, -10, -11, -12, -13, and -14 is prepared similarly, and it can be used, being able to choose a suitable clone.

[0048] Example 4 Manufacture active type MMP-1 of an active type MMPs Potential mold MMP-1 refined from the man skin fiber blast cell (CCD-41SK) culture supernatant 0.1M sodium chloride, It dissolves in the 10mM calcium chloride content 50mM tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 7.5) (buffer solution A). Amino phenyl MAKYURIKKU acetate (APMA) was added so that final concentration might be set to 1mM, and the incubation of the 37 degrees C was carried out for 2 hours (14 J. Zhang et al., Clin.Chim.Acta, 219, 1- 1993). It was checked that man potential mold MMP-1 had been completely activated by SDS-PAGE (under 12.5% gel and 2-mercaptoethanol existence) active MMP-1.

[0049] Active MMP-2 dissolve potential mold MMP-2 refined from the CCD-41SK culture supernatant in the above-mentioned buffer solution A, and they are 1mM. 37 degrees C was obtained by carrying out an incubation for 30 minutes by APMA (103 N. Fujimoto et al., Clin.Chim.Acta, 221, 91- 1993). It was checked that potential mold MMP-2 had been activated by active MMP-2 on SDS-PAGE. In the case of manufacture of a publication in the example 3 of man pro MMP-7, it sets to processing in a zinc chelate sepharose (product made from Pharmacia) column, and active MMP-7 are 1mM CaCl<sub>2</sub> and 0.05%. Brij35, 0.02% NaN<sub>3</sub> It is 0.15M when eluted by the concentration gradient of NaCl dissolved in the content 25mM sodium-cacodylate buffer solution (pH 6.5). It might be eluted with the NaCl content said buffer solution.

[0050] Active MMP-9 dissolve potential mold MMP-9 refined from man fiber sarcomata cell HT1080 culture supernatant in the buffer solution A, and they are 1mM. 37 degrees C was obtained by carrying out an incubation for 24 hours by APMA (21719 Y. Okada et al., J.Biol.Chem., 267, 21712- 1993). It was checked that potential mold MMP-9 had been activated by active MMP-9 on SDS-PAGE. MMP-3 (741 Y. Okada et al., Biochem.J., 254,731- 1988), MMP-8 (304 V. Knauper et al., Biol.Chem.Hoppe-Seyler., 371,295- 1990), MMP-10 (1590 A. J.Park et al., J.Biol.Chem., 266, 1584- 1991), MMP-11

(25855 D. Pei et al., J.Biol.Chem., 269, 25849- 1994), MMP-12 (23829 S. D.Shapiro et al., J.Biol.Chem., 268, 23824- 1993), About MMP-13 (16773 J. M.P.Freije et al., J.Biol.Chem., 269, 16766- 1994) and MMP-14 (Japanese Patent Application No.

No. 331305 [ six to ]), each active type MMP is prepared and it can be used similarly.  
 [0051] example 5 Method-of-preparation J.Immunoassay of (Assay a) monoclonal antibody joint support of an active type MMPs 4,209- Ishikawa given in 327 and 1983 et the method of al. -- following -- mouse anti-man MMPs IgG (clone No.78-12G8, 75-7F7, or 73-18B3) was dissolved in the each 0.1M phosphate buffer solution (pH 7.5), and it prepared to 100microg [ /ml ] concentration. The monoclonal antibody solution was added to 96 hole microplate every [ 100micro / per well / ], and was put 4 degrees C for 24 hours. Next, a monoclonal antibody solution is removed and they are after 2 times washing and 1% respectively at a 0.1M sodium chloride content 10mM phosphate buffer solution (pH 7.0). It flooded with the BSA, 0.1M sodium chloride, and 10mM calcium chloride content 50mM tris-hydrochloric-acid buffer solution (the pH 7.4 buffer solution B), and saved at 4 degrees C.

[0052] (b) Since all MMPs(es) except MMP-2 and MMP-9 have the common property in which the latent type does not combine with TIMPs, but only the active type of isolation combines with TIMPs, among the assays MMPs of an active type MMPs, the fixed quantity of them all is carried out by law of identity. Therefore, the assay of active MMP-1 was indicated as an example of representation as an example. Moreover, in order that TIMP-2 or TIMP-1 might join together respectively also with a latent type about MMP-2 or MMP-9, in order to perform potentiality type judgment, the assay which used TIMP-2 which gave indirectly TIMP-1 or the indicator object which gave the indicator object directly was indicated.

[0053] 1) Active MMP-1 indicated in the assay example 4 of active MMP-1 was made into the standard, and the sample containing active MMP-1 of known concentration or active MMP-1 of isolation was respectively 20microL Added to 96 hole vinyl plate (product made from Falcon). next, rTIMP-2- which diluted with the buffer solution B the rTIMP-1-HRP complex prepared by the example 2 (a) term so that it might become in ml and 5microg /, or prepared it by the example 2 (b) term -- anti- -- TIMP-2 IgG-HRP complex was diluted with the buffer solution B so that it might become in ml and 18microg /, and in addition to the above-mentioned vinyl plate 100micro [ of each ] l every, it mixed. 100microL In addition to the anti-MMP-1 antibody (clone No.78-12G8) joint plate which prepared this mixed liquor by the aforementioned (a) term, it was made to react at a room temperature for 2 hours, and a physiological salt solution washed 3 times. Next, 2mg/ml o-phenylenediamine which dissolved in the 0.02% hydrogen-peroxide content 0.1M citric-acid-phosphate buffer solution (pH 4.9) was 100micro per well ] l Added, 100micro of 2-N sulfuric acids l was added after the reaction for 20 minutes at the room temperature, and the reaction was stopped. The absorbance (A492) in 492nm of this reaction mixed liquor was measured using the microplate reader (MPR- A4, TOSOH), and the calibration curve was created ( drawing 1 ). The sensitivity of the fixed quantity system using rTIMP-1-HRP complex is 5 ng(s)/ml (84pg / assay) from standard 0 ng/ml value +2S.D., and linearity was accepted in the range with active MMP-1 standard solution of 20 to 640 ng/ml (0.33 - 10.7ng / assay). The sensitivity of the assay using rTIMP-2-IgG-HRP complex is 1.3 ng/ml (22pg / assay), and linearity was accepted in the range with active MMP-1 standard solution of four to 330 ng/ml (67 - 5500pg / assay). In addition, the result as the assay which used rTIMP-1-HRP complex also with the almost same assay using rTIMP-2-HRP complex was obtained.

[0054] 2) Active MMP-2 indicated in the assay example 4 of active MMP-2 were made into the standard, and the sample containing active MMP-2 of known concentration or active MMP-2 of isolation was respectively 20microL Added to 96 hole vinyl plate. Next, the rTIMP-1-HRP complex prepared by the example 2 (a) term was diluted with the buffer solution B so that it might become in ml and 5microg /, and respectively in addition to the above-mentioned vinyl plate, it mixed every 100micro / l ]. In addition to the mouse anti-MMP-2 antibody (clone No.75-7F7) joint plate which prepared this mixed liquor by the aforementioned (a) term, the following operations were performed like the above 1. The calibration curve was shown in drawing 2 . The sensitivity of this assay is 34 ng(s)/ml (0.57ng / assay) from standard 0 ng/ml value +2S.D., and linearity was accepted in 34 to 930 ng/ml (0.57 - 15.5ng / assay).

[0055] 3) Active MMP-9 indicated in the assay example 4 of active MMP-9 were made into the standard, and the sample containing active MMP-9 of known concentration or active MMP-9 of isolation was respectively 20microL Added to 96 hole vinyl plate. Next, the rTIMP-2-IgG-HRP complex prepared by the example 2 (b) term was diluted with the buffer solution B so that it might become in ml and 18microg /, and respectively in addition to the above-mentioned vinyl plate, it mixed every 100micro / l ]. the mouse which prepared this mixed liquor by the aforementioned (a) term -- anti- -- in addition to Homo sapiens MMP-9 antibody (clone No.73-18B3) joint plate 100microL, the following operations were performed like the above 1 The calibration curve was shown in drawing 3 . The sensitivity of this system of measurement is 5 ng(s)/ml (84pg / assay) from standard 0 ng/ml value +2S.D., and linearity was accepted in ten to 320 ng/ml (0.17 - 5.3ng / assay). the same -- carrying out -- MMP-3, -7, -8, -10, -11, -12, and -13 -- and even if it attaches -14, the judgment fixed quantity of each active type MMP is carried out

[0056] Example 6 The synovial fluid of the osteoarthritis (OA) patient as the rheumatoid arthritis (RA) and control where organization destruction is advancing as the inside of a Homo sapiens synovial fluid, and a fixed quantity sample of the active type MMPs in a Homo sapiens blood serum, And a Homo sapiens blood serum is used. MMP-2 (103 N. Fujimoto et al., Clin.Chim.Acta, 221, 91- 1993) in which elevation of level is accepted by RA patient blood serum by the method of a publication in the example 4 (b) term 2 rTIMP-1-HRP and anti-MMP-2 antibody It used and active MMP-2 of isolation were measured. All of active MMP-2 concentration of isolation in OA patient synovial fluid and a Homo sapiens blood serum were below the sensitivity of this assay. Although a part of active MMP-2 concentration of isolation in RA patient synovial fluid to which organization destruction is advancing on the other hand was below sensitivity, it was more remarkably [ than active

MMP-2 concentration of isolation in OA patient synovial fluid and a Homo sapiens blood serum ] high ( drawing 4 ).  
Although active MMP-2 were not detected in OA patient synovial fluid and the Homo sapiens blood serum, it is known that TIMPs of a free state exists in these samples, and it is in agreement with the active type MMPs of a free state not existing. Although the clinical application of active MMP-2 assay was shown as an example, in a cell, an organization homogenate, a synovial fluid, blood, or urine from a patient with disorders, such as organization destruction, inflammation, or cancer transition, etc., the judgment fixed quantity of the active type MMPs of a free state becomes possible by this assay.

[0057]

[Effect of the Invention] this invention -- every -- the monoclonal antibody which can recognize MMP specifically, and every -- immunological measurement of each active type MMP of isolation can be attained by using TIMP the monoclonal antibody which recognizes especially the active type MMP in a specimen, and every -- by using TIMP, each active type MMP of isolation can be measured and, as a result, the fixed quantity of the active type MMP can be carried out to a sensitivity row often [ precision ] and quickly And since the judgment fixed quantity of each active type MMP considered to carry out important work also in inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, cancer, and neoplastic disease by the ability attaining immunological measurement of MMP in this way can be carried out often [ precision ] and quickly, the path is paved for a diagnosis of these inflammatory reaction, and it is still more useful as diagnostic agents, such as inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, neoplastic disease, and a metastatic carcinoma.

[Translation done.]

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the standard curve of active MMP-1.

[Drawing 2] It is drawing showing the standard curve of active MMP-2.

[Drawing 3] It is drawing showing the standard curve of active MMP-9.

[Drawing 4] It is drawing showing active MMP-2 amount of isolation in RA patient, OA patient synovial fluid, or a Homo sapiens blood serum.

---

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

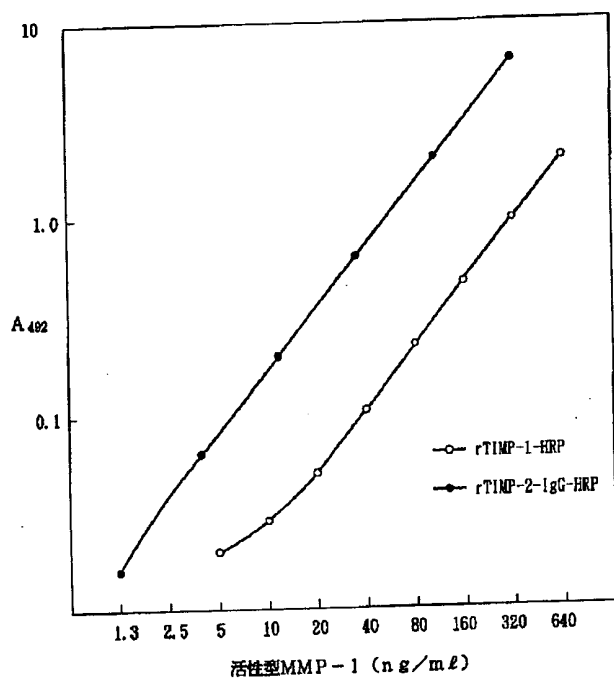
Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

[Drawing 1]

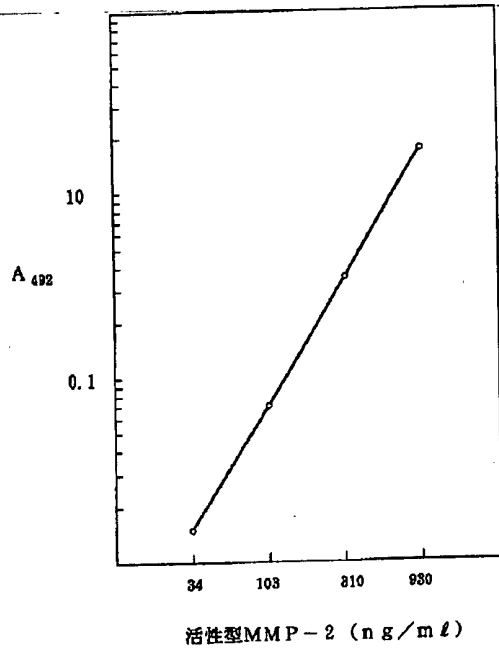
図 1



[Drawing 2]

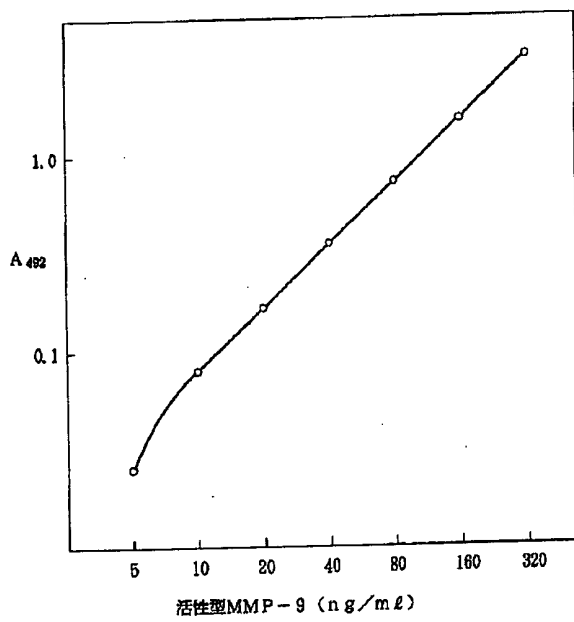


図 2



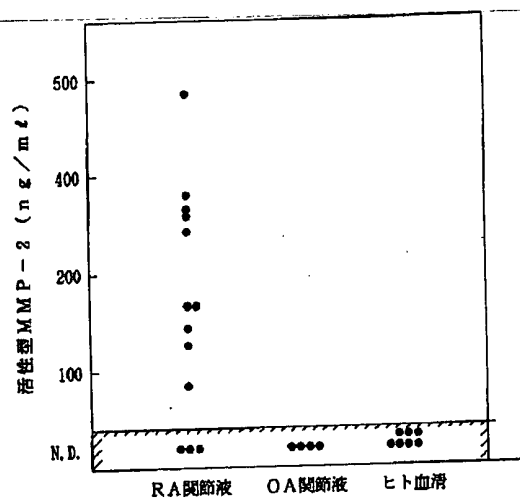
[Drawing 3]

図 3



[Drawing 4]

図4



N.D. : 感度以下

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**


---

**[Claim(s)]**

- [Claim 1] The judgment assay of the active matrix METARO proteases of the isolation characterized by using combining the inhibitor of the monoclonal antibody specifically combined to a matrix METARO protease, and a matrix METARO protease.
- [Claim 2] The inhibitor of the monoclonal antibody specifically combined to a matrix METARO protease as an object for solid phase support combination, or a matrix METARO protease The inhibitor of the monoclonal antibody specifically combined to an each matrix METARO protease as an object for indicator object grant or a matrix METARO protease is used. By the monoclonal antibody which either a solid phase support connective and an indicator object grant object combine specifically to a matrix METARO protease The assay according to claim 1 which another side is the inhibitor of a matrix METARO protease, and is characterized by using combining them respectively.
- [Claim 3] It is tissue as an inhibitor of a matrix METARO protease. Inhibitor OBU The METARO protease -1 or tissue Inhibitor OBU Assay according to claim 1 or 2 characterized by using the METARO protease -2.
- [Claim 4] The assay according to claim 1 or 2 characterized by using respectively the antibody in a matrix METARO protease molecule which recognizes a central field or a carboxyl-terminus field at least as a monoclonal antibody specifically combined to a matrix METARO protease.
- [Claim 5] A monoclonal antibody, tissue Inhibitor OBU The METARO protease -1 and tissue Inhibitor OBU Assay of the any 1 publication according to claim 2 to 4 characterized by using an indicator object as a detectable indicator what chosen from the group which consists of the METARO protease -2 using what was given directly.
- [Claim 6] The assay of any 1 publication of the claims 2-4 characterized by including as an indicator means carrying out the indicator of the inhibitor of a matrix METARO protease to the inhibitor of the matrix METARO protease which gave the indicator object using the antibody combined specifically.
- [Claim 7] The assay according to claim 6 characterized by performing fixed operation so that an immune complex may not dissociate using a cross linking agent after carrying out the indicator of the inhibitor of a matrix METARO protease to the inhibitor of the matrix METARO protease which gave the indicator object using the antibody combined specifically.
- [Claim 8] The assay according to claim 7 characterized by using formaldehyde as a cross linking agent.
- [Claim 9] The assay of the any 1 publication according to claim 6 to 8 characterized by using the monoclonal antibody of the inhibitor which recognizes a carboxyl-terminus field at least as a monoclonal antibody specifically combined with the inhibitor of a matrix METARO protease.
- [Claim 10] As an antibody specifically combined with the inhibitor of a matrix METARO protease, it is tissue. Inhibitor OBU The METARO protease -1 or tissue Inhibitor OBU Assay of the any 1 publication according to claim 6 to 9 characterized by using the antibody specifically combined with the METARO protease -2.
- [Claim 11] It is tissue as an inhibitor of a matrix METARO protease. Inhibitor OBU The claim 1 characterized by measuring the active matrix METARO protease of isolation using the antibody which recognizes the central field or carboxyl-terminus field of each matrix METARO protease molecule as a monoclonal antibody which combines the METARO protease -1 specifically to each matrix METARO protease, a claim 2, and assay of any 1 publication according to claim 5 to 10.
- [Claim 12] It is tissue as an inhibitor of a matrix METARO protease. Inhibitor OBU The METARO protease -1 The antibody which recognizes the central field or carboxyl-terminus field of each matrix METARO protease molecule as a monoclonal antibody specifically combined to each matrix METARO protease is used. The assay according to claim 11 characterized by measuring what chosen from the group which consists of the active matrix METARO protease -1 of isolation, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, and -14.
- [Claim 13] It is tissue as an inhibitor of a matrix METARO protease. Inhibitor OBU The METARO protease -1 The antibody which recognizes the central field or carboxyl-terminus field of each man matrix METARO protease molecule as a monoclonal antibody specifically combined to each matrix METARO protease is used. The assay according to claim 11 or 12 characterized by measuring what chosen from the group which consists of the man active type matrix METARO protease -1 of isolation, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, and -14.
- [Claim 14] It is tissue as an inhibitor of a matrix METARO protease. Inhibitor OBU The claim 1 characterized by measuring the active matrix METARO protease of isolation using the antibody which recognizes the central field or carboxyl-terminus field of each matrix METARO protease molecule as a monoclonal antibody which combines the METARO protease -2 specifically to each matrix METARO protease, a claim 2, and assay of any 1 publication according to claim 5 to 10.

[Claim 15] It is tissue as an inhibitor of a matrix METARO protease. Inhibitor OBU The METARO protease -2 The antibody which recognizes the central field or carboxyl-terminus field of each matrix METARO protease molecule as a monoclonal antibody specifically combined to each matrix METARO protease is used. The assay according to claim 14 characterized by measuring what chosen from the group which consists of the active matrix METARO protease -1 of isolation, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, and -14.

[Claim 16] It is tissue as an inhibitor of a matrix METARO protease. Inhibitor OBU The METARO protease -2 The antibody which recognizes the central field or carboxyl-terminus field of each Homo sapiens matrix METARO protease molecule as a monoclonal antibody specifically combined to each matrix METARO protease is used. The assay according to claim 14 or 15 characterized by measuring what chosen from the group which consists of the Homo sapiens active type matrix METARO protease -1 of isolation, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, and -14.

[Claim 17] The reagent for judgment fixed quantities of the active matrix METARO proteases of the isolation characterized by using the monoclonal antibody specifically combined to a matrix METARO protease, and the inhibitor of a matrix METARO protease.

[Claim 18] The reagent according to claim 17 characterized by a reagent containing the inhibitor of the matrix METARO protease to which the detectable indicator was given.

[Claim 19] The reagent according to claim 17 characterized by including that with which it combined with specifically and the reagent combined a monoclonal antibody and the inhibitor of a matrix METARO protease with a detectable indicator to the inhibitor of a matrix METARO protease.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-226918

(43) 公開日 平成8年(1996)9月3日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 15/02			C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08			G 0 1 N 33/573	Z
G 0 1 N 33/573			33/577	B
33/577	9162-4B		C 1 2 N 15/00	C
審査請求 有 請求項の数19 F D (全 22 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-53794

(22) 出願日 平成7年(1995)2月20日

(71) 出願人 390010205

富士薬品工業株式会社

富山県高岡市長慶寺530番地

(72) 発明者 藤本 昇

富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内

(72) 発明者 山城 隆之

富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内

(72) 発明者 横川 信子

富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 水野 昭宣

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遊離の活性型マトリックスメタロプロテアーゼ類の分別定量法

## (57) 【要約】

【目的】 組織や体液中に存在するマトリックスメタロプロテアーゼ類 (MMPs) のうちマトリックス成分の分解に直接関与する活性型MMPsの簡単且つ迅速な分別定量法を提供し、MMPs活性が亢進する疾患、例えば関節症、癌の浸潤、転移及び肺線維症のような病態の診断及びモニターを可能にせしめる。

【構成】 簡単な操作及び試薬を用い、感度並びに精度良く、また迅速な遊離の活性型MMPsの分別定量法は、各MMPに特異的に結合するモノクローナル抗体と、ティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼ類 (TIMPs) あるいはTIMPsと各TIMPに特異的に結合するモノクローナル抗体との複合物を組合せて使用することにより達成できる。特に固相担体結合物及び標識物付与物のいずれか一方がマトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体で、他方がマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターであり、それらをそれぞれ組み合わせて用いることが好ましい。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体及びマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターを組み合わせて用いることを特徴とする遊離の活性型マトリックスメタロプロテアーゼ類の分別定量法。

【請求項2】 固相担体結合用としてマトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体あるいはマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターを、標識物付与用として各々マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体あるいはマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターを用い且つ、固相担体結合物及び標識物付与物のいずれか一方がマトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体で、他方がマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターであり、それらをそれぞれ組み合わせて用いることを特徴とする請求項1記載の定量法。

【請求項3】 マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとしてティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼー1あるいはティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼー2を用いることを特徴とする請求項1又は2記載の定量法。

【請求項4】 マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体として各々マトリックスメタロプロテアーゼ分子中の少なくとも中央領域またはカルボキシル末端領域を認識する抗体を用いることを特徴とする請求項1又は2記載の定量法。

【請求項5】 モノクローナル抗体、ティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼー1及びティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼー2から成る群から選ばれたものに標識物を直接付与したものをを用いて検知可能な標識とすることを特徴とした請求項2〜4記載のいずれか記載の定量法。

【請求項6】 標識物を付与したマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターに特異的に結合する抗体を用いてマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターを標識することを標識手段として含むことを特徴とする請求項2〜4のいずれか記載の定量法。

【請求項7】 標識物を付与したマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターに特異的に結合する抗体を用いてマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターを標識した後、架橋剤を用い免疫複合体が解離しないように固定操作を行うことを特徴とする請求項6記載の定量法。

【請求項8】 架橋剤としてホルムアルデヒドを用いることを特徴とする請求項7記載の定量法。

【請求項9】 マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターに特異的に結合するモノクローナル抗体として、そのインヒビターの少なくともカルボキシル末端領

域を認識するモノクローナル抗体を用いることを特徴とする請求項6〜8記載のいずれか記載の定量法。

【請求項10】 マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターに特異的に結合する抗体として、ティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼー1あるいはティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼー2に特異的に結合する抗体を用いることを特徴とする請求項6〜9記載のいずれか記載の定量法。

【請求項11】 マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとしてティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼー1を、各マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体として各マトリックスメタロプロテアーゼ分子の中央領域またはカルボキシル末端領域を認識する抗体を用い、遊離の活性型マトリックスメタロプロテアーゼを測定することを特徴とする請求項1、請求項2及び請求項5〜10記載のいずれか記載の定量法。

【請求項12】 マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとしてティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼー1を、各マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体として各マトリックスメタロプロテアーゼ分子の中央領域またはカルボキシル末端領域を認識する抗体を用い、遊離の活性型マトリックスメタロプロテアーゼー1、ー2、ー3、ー7、ー8、ー9、ー10、ー11、ー12、ー13及びー14から成る群から選ばれたものを測定することを特徴とする請求項11記載の定量法。

【請求項13】 マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとしてティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼー1を、各マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体として各ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ分子の中央領域またはカルボキシル末端領域を認識する抗体を用い、遊離のヒト活性型マトリックスメタロプロテアーゼー1、ー2、ー3、ー7、ー8、ー9、ー10、ー11、ー12、ー13及びー14から成る群から選ばれたものを測定することを特徴とする請求項11又は12記載の定量法。

【請求項14】 マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとしてティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼー2を、各マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体として各マトリックスメタロプロテアーゼ分子の中央領域またはカルボキシル末端領域を認識する抗体を用い、遊離の活性型マトリックスメタロプロテアーゼを測定することを特徴とする請求項1、請求項2及び請求項5〜10記載のいずれか記載の定量法。

【請求項15】 マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとしてティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼー2を、各マトリックスメタロプロテア

ーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体として各マトリックスメタロプロテアーゼ分子の中央領域またはカルボキシル末端領域を認識する抗体を用い、遊離の活性型マトリックスメタロプロテアーゼ1、-2、-3、-7、-8、-9、-10、-11、-12、-13及び-14から成る群から選ばれたものを測定することを特徴とする請求項14記載の定量法。

【請求項16】 マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとしてティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼ-2を、各マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体として各ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ分子の中央領域またはカルボキシル末端領域を認識する抗体を用い、遊離のヒト活性型マトリックスメタロプロテアーゼ1、-2、-3、-7、-8、-9、-10、-11、-12、-13及び-14から成る群から選ばれたものを測定することを特徴とする請求項14又は15記載の定量法。

【請求項17】 マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体とマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとを用いることを特徴とする遊離の活性型マトリックスメタロプロテアーゼ類の分別定量用試薬。

【請求項18】 試薬が、検知可能な標識の付されたマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターを含むことを特徴とする請求項17記載の試薬。

【請求項19】 試薬が、マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターに対し特異的に結合し且つ検知可能な標識を持つモノクローナル抗体とマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとを結合したものを含むことを特徴とする請求項17記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、医学的生理学的分野に係るものであり、遊離のマトリックスメタロプロテアーゼ類(MMPs)、とりわけ遊離の活性型MMPsの分別定量法に関する。さらに詳しく言えば、本発明はMMPsに対し特異的に結合する各々のモノクローナル抗体及びMMPsのインヒビターであるティッシュ インヒビター オブメタロプロテアーゼ類(TIMPs)を用いて、遊離の活性型MMPsを分別定量する方法に関する。

【0002】

【背景技術】細胞外マトリックスは、コラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、フィブロネクチン及びラミニンなどの接着性糖タンパク質から構成されている(Martinez-Hernandez et al., Lab. Invest., 48, 656-677, 1983)。これらマトリックス成分の分解にはマトリックスメタロプロテアーゼ類(MMPs)が重要な役割を果

たしていることは周知のことである。知られているMMPの種類とそのナンバリングは以下になっている。間質型コラーゲナーゼ(MMP-1)、72キダルトン(kD)ゼラチナーゼ(MMP-2)、ストロムライシン-1(MMP-3)、PUMP-1(MMP-7)、好中球コラーゲナーゼ(MMP-8)、92kDゼラチナーゼ(MMP-9)、ストロムライシン-2(MMP-10)、ストロムライシン-3(MMP-11)、マクローファージメタロエラスターゼ(MMP-12)、コラーゲナーゼ-3(MMP-13)及び膜型MMP(MT-MMP, MMP-14)である(H. Birkedal-Hansen et al., Oral Biol. Med., 4, 197-250, 1993; S. D. Shapiro et al., J. Biol. Chem., 268, 23824-23829, 1993; J. M. P. Freije et al., J. Biol. Chem., 269, 16766-16773, 1994; H. Sato et al., Nature, 370, 61-65, 1994)。

【0003】MMPsは、細胞内で合成、産生され、必要に応じて細胞外へ前駆体(プロ体もしくは潜在型)として放出される。潜在型MMPsはアミノ末端よりプロペプチド、活性中心領域(中央領域)及びカルボキシル末端領域などから構成されており、その潜在型MMPs自身はマトリックス成分の分解には関与せず、体内ではプラスミンやMMP-3などにより限定分解を受けて活性化され、あるいは実験的にはチオール基反応性有機水銀化合物などによりアミノ末端プロペプチドが切断され活性型MMPsとなり、各々の基質に対応するマトリックス成分を分解することが知られている(H. Birkedal-Hansen et al., Oral Biol. Med., 4, 197-250, 1993)。また組織や体液中においてMMPs活性を特異的に阻害するMMPsのインヒビターであるティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼ類(TIMPs)が存在することが知られている(T. Hayakawa, Cell struct. Funct., 19, 109-114, 1994)。TIMPsは現在3種類報告されており、各々TIMP-1、TIMP-2及びTIMP-3と呼ばれている。これらTIMPsは、通常活性型MMPsに結合し、組織の修復、組織破壊の阻止、癌転移抑制あるいは細胞増殖促進などの生理的作用を持っていると考えられている。またTIMP-1は潜在型MMP-9に、TIMP-2は潜在型MMP-2に結合し、各々のMMPsの活性化及び自己分解活性を制御していると考えられている。

【0004】

【解決すべき課題】遊離の活性型MMPsの測定は、組織や体液中に存在するMMPsのうちマトリックス成分の分解に直接関与する活性型MMPs量を知る手段とな



り得るものである。従って、遊離の活性型MMPsを定量することにより、MMPs活性が亢進する疾患、例えば関節症、癌の浸潤、転移、歯周病及び肺線維症のような病態の診断あるいはモニターを行うことが可能となる。ところが、活性型MMPs量を測定する方法としては、一般的に考えられるのは各々の基質を分解させるところの酵素活性による方法であるが、組織中や体液中には、他のMMPsやTIMPsが存在しており、また各MMPの基質特異性が広いことからMMPsの分別定量は困難であった。Zucker et al. (PCT WO93/20447) は二種類の抗体すなわち各MMPに対する抗体及び各TIMPに対する抗体を用い、MMP-TIMP複合体を測定している。この方法では既に形成された不活性なMMP-TIMP複合体を測定するのみで、マトリックス成分の分解に直接関わる遊離状態にある活性型MMPs (遊離の活性型MMPs) を測定することはできない。またTIMPsは全ての活性型MMPsと結合し、さらにTIMP-1あるいはTIMP-2は各々潜在型MMP-9あるいは潜在型MMP-2とも結合することから、一つの活性型MMPを定量するには、TIMP-1、TIMP-2及びTIMP-3との複合体をすべて定量しなければならず、さらにMMP-2及びMMP-9については潜在型MMPsと複合体との分別定量が必要となるため正確な活性型MMPs量を定量するのは困難である。こうして現在まで遊離状態にある活性型MMPsのみの定量法については報告がない。さらに潜在型MMPを認識せず活性型MMPsのみに特異的な抗体を用いれば活性型MMPsを測定できると考えられるが、未だこのような抗体が得られたという報告もない。

#### 【0005】

【課題の解決】本発明の目的は、簡単な操作及び試薬を用い、感度並びに精度良く、また迅速にそれぞれの活性型MMPs量を分別して定量し得る方法を提供することにある。こうした方法に用いる試薬キットを提供することも本発明の目的の一つである。本発明者らは、活性型MMPsに結合し、その活性を抑制するインヒビター、例えばTIMPs、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、ペプチドインヒビター及び合成化合物などのうち、TIMPsがすべてのMMPsの活性型に特異的に結合することに着目し、各MMPに特異的に結合する抗体とTIMPsとの組合せにより簡便な遊離の活性型MMPsの分別定量法を提供できるのではないかと考えて、鋭意研究の結果、各MMPに特異的に結合する抗体と、TIMPsあるいはTIMPsと各TIMPに特異的に結合する抗体との複合物を組合せて使用する遊離の活性型MMPsの分別定量法を確立した。さらにTIMPsを標識付与用として用いる場合、TIMPsの活性型MMPsに対する結合能を損することなく直接または間接的に標識物を付与することに成功し、この標識物を付与したTIMP

sと各MMPに特異的に結合する抗体とを組合せることにより、簡便な遊離の活性型MMPsの分別定量法を確立した。特に直接標識物を付与したTIMP-1と各MMPに特異的に結合する抗体とを組み合わせる用いる場合、遊離の活性型MMP-1、-2、-3、-7、-8、-10、-11、-12、-13及び-14を定量することができ、直接標識物を付与したTIMP-2と各MMPに特異的に結合する抗体とを組み合わせる用いる場合、遊離の活性型MMP-1、-3、-7、-8、-9、-10、-11、-12、-13及び-14を定量することができる。さらに固相用にTIMP-1あるいはTIMP-2を用いる場合も上記と同様各々の遊離の活性型MMPsを定量することができる。

【0006】またさらに各MMPに特異的に結合する抗体と各TIMPとを組み合わせる用いる場合、標識物を付与した抗TIMP抗体を用いて間接的に標識物を付与した各TIMPを用いることにより、すべての遊離の活性型MMPs、すなわちMMP-1、-2、-3、-7、-8、-9、-10、-11、-12、-13及び-14を定量することができる。本発明は、TIMPsから成る群から選ばれたものと各MMPに対するモノクローナル抗体から成る群から選ばれたものとを組合せて用い、その組合せ成分の一方を直接あるいは間接に検知可能な標識物を付与した成分とし、他の組合せ成分を固相化した成分として用い、被検試料中の遊離の活性型MMPsを分別定量する方法及びその方法に用いる試薬を提供することにある。こうして典型的には本発明の目的は、上記の標識物を付与したTIMPs (各TIMPに対する標識物を付与した各モノクローナル抗体で間接的に標識物を付与したTIMPsを含む) あるいは各MMPに対するモノクローナル抗体及び固相担体用として各MMPに対するモノクローナル抗体あるいはTIMPsを用い、被検試料中の遊離の活性型MMPsを分別定量する優れた方法及びその為の試薬キットを提供することにある。本発明はこうした遊離の活性型MMPsを分別定量することのできる試薬キットのうちの各試薬をすべてその実施態様のうちに含むと理解される。さらに本発明の目的は、上記定量法を用いて遊離の活性型MMPsを分別定量することにより、組織破壊や癌転移などの病態をモニターし得る方法並びに試薬あるいは診断剤を提供することにある。したがって、医学的生理学的分野における上記試薬の各種利用、組織破壊や癌転移、組織の修復の程度の判断、あるいは細胞増殖促進などの生理的作用の指標として上記試薬を使用することはすべて本発明のその実施態様のうちに含むと理解される。

【0007】本発明に従った態様によれば、例えば下記の定量法が提供される。

(1) 標識物が付与されたTIMPsと各MMPに特異的に結合するモノクローナル抗体あるいは(2) TIMPに特異的に結合するモノクローナル抗体を介して標識

物が付与されたTIMPsと各MMPに特異的に結合するモノクローナル抗体をそれぞれ用い、個々の活性型MMPを標準物質として、被検試料中の個々の遊離の活性型MMPの分別定量を行うことを特徴とする遊離の活性型MMPsの定量法及びそれに用いる試薬。本発明の定量法において、使用されるMMPに特異的に結合するモノクローナル抗体は、各々のMMPに特異的に結合し、別のMMPsと交差反応しないモノクローナル抗体で、特に各MMPの中央領域またはカルボキシル末端領域を認識するものが挙げられる。

【0008】本発明で使用されるMMPsに対するインヒビターは、MMP遺伝子ファミリー由来のMMPsに対するインヒビターを含んでいてよく、例えばTIMP-1、TIMP-2といったMMPsに対するインヒビターであることができる。TIMP-1は、最初MMP-1を阻害することからコラゲナーゼインヒビターと呼ばれていたが、その後ゼラチナーゼやストロムライシンも阻害することからTIMPと呼ばれるようになったもので、オタマジャクシからヒトに至る由来の異なるコラゲナーゼを広く阻害する。TIMP-1は、多くの体外培養組織、例えば大動脈、軟骨、胎児骨、腱、歯髄、歯肉、滑膜、子宮など、培養細胞、例えば線維芽、上皮、内皮、骨芽、軟骨、平滑筋などの細胞、血小板、単球、マクロファージ、腫瘍細胞などにより産生されていることが認められ、歯髄由来細胞、ヒト胎盤などから得ることができ、例えばKodama et al., Collagen Rel. Res., 7, 341-350, 1987及びJ. Biochem. 96, 395-404, 1984に記載の方法に従い、ウシの未萌出歯の根部歯髄といったウシ歯髄由来細胞の培養液から単離したり、Kodama et al., J. Immunol. Methods, 127, 103-108, 1990に記載の方法に従いヒト胎盤などから得ることができる。

【0009】TIMP-2は、その含有アミノ酸配列がTIMP-1とホモロジーを有する部位を持つことが知られている。TIMP-2は、マウス結腸癌細胞、例えばcolon26細胞、ヒト胎盤などから得ることができ、例えばFujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 220, 31-45, 1993、特開平6-300757号公報などに記載の方法に従いヒト胎盤などから得ることができる。TIMP-1及びTIMP-2は、遺伝子組換えの技術で得ることもでき、例えばWilliamson et al., Biochem. J., 268, 267-274, 1990、Boone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2800-2804, 1990に記載の方法を参考にして得ることができる。これらTIMPsは、従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどに

よるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してから用いることができる。基本的にはMMPsに対するインヒビターであるものを、限定されることなく利用できるが、好ましくは活性型MMPsに特異的に結合できるものが挙げられる。

【0010】本発明で使用されるモノクローナル抗体は、ケラー及びミルシュタイン(Kohler, G. & Milstein, C.) (Nature, 256, 495-497, 1975) などにより開示されたミエローマ細胞を用いての細胞融合技術を利用して得られたモノクローナル抗体であってもよいことはいうまでもない。本発明で使用されるモノクローナル抗体は、次のような工程で作製できる。

1. 免疫原性抗原の調製
2. 免疫原性抗原による動物の免疫
3. ミエローマ細胞(骨髄腫細胞)の調製
4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合
5. ハイブリドーマ(融合細胞)の選択及びモノクローン化

#### 6. モノクローナル抗体の製造

##### 【0011】1. 免疫原性抗原の調製

抗原としては、例えばKodama et al., Collagen Rel. Res., 7, 341-350, 1987及びKodama et al., J. Immunol. Methods, 127, 103-108, 1990に記載の方法により調製したTIMP-1、Fujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 220, 31-45, 1993に記載の方法により調製したTIMP-2、特開平5-199868号に記載の方法に従い調製したリコンビナントTIMP-1(rTIMP-1)、Aoki et al., Connective Tissue, 1994, in pressに記載の方法に従い調製したリコンビナントTIMP-2(rTIMP-2)などを用いることができる。ここでは、MMPs活性を阻害するTIMPsであればどのTIMPsでも使用できる。

【0012】また抗原としては、例えばZhang et al., Clin. Chim. Acta, 219, 1-14, 1993に記載の方法に従い調製したMMP-1、Fujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 221, 91-103, 1993に記載の方法に従い調製したMMP-2、Okada et al., Biochem. J., 254, 731-741, 1988に記載の方法に従い調製したMMP-3、Knauper et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler., 371, 295-304, 1990に記載の方法により調製したMMP-8、Okada et al., J. Biol. Che

m., 267, 21712-21719, 1992に記載の方法に従い調製したMMP-9、Park et al., J. Biol. Chem., 266, 1584-1590, 1991に記載の方法に従い調製したリコンビナントMMP-10、Pei et al., J. Biol. Chem., 269, 25849-25855, 1994に記載の方法に従い調製したリコンビナントMMP-11、Shapiro et al., J. Biol. Chem., 268, 23824-23829, 1993に記載の方法に従い調製したMMP-12及びリコンビナントMMP-12、Freije et al., J. Biol. Chem., 269, 16766-16773, 1994に記載の方法に従い調製したリコンビナントMMP-13、特願平6-331305号に記載の方法に従い調製したMMP-14などで、それらの文献やそこで引用する文献に記載の方法に従い調製したMMPs、さらには遺伝子組み換え等によって得られたMMPsなどを用いることができる。

【0013】ここでは、潜在型や活性型のものが好ましく使用できる。こうした抗原は、各種原料、例えば培養細胞、培養組織など、形質転換体細胞などの抗原産生材料から従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミド電気泳動、モノクローナル抗体などの抗原を特異的に認識する抗体あるいはインヒビターを固定化したものを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくはゼラチン-アガロース・アフィニティ・クロマトグラフィー、ヘパリン-アガロース・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0014】こうして得られた抗原は、さらに免疫原性コンジュゲートなどにしてもよいが、そのまま適当なアジュバントと混合して動物を免疫するのに使用できる。さらに抗原は、それを断片化したものを適当な縮合剤を介して種々の担体タンパク質類と結合させてハプテンタンパク質の如き免疫原性コンジュゲートとし、これを用いて特定の配列のみを認識できるモノクローナル抗体をデザインするのに用いることもできる。例えば、Boone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2800-2804, 1990に記載のヒトTIMP-2のcDNA配列から予測されるアミノ酸配列をもつポリペプチドをデザインして合成して得られたポリペプチドを用いることが挙げられる。デザインされるポリペプチドには予めシステイン残基などを付加し、免疫原性コンジュゲートの調製を容易にできるようにしておくことができる。担体タンパク質類と結合させるにあたっては、担体タンパク質類はまず

活性化されることができる。こうした活性化にあたり活性化結合基を導入することが挙げられる。

【0015】活性化結合基としては、(1) 活性化エステルあるいは活性化カルボキシル基、例えばニトロフェニルエステル基、ペンタフルオロフェニルエステル基、1-ベンゾトリアゾールエステル基、N-スクシンイミドエステル基など、(2) 活性化ジチオ基、例えば2-ピリジルジチオ基などが挙げられる。担体タンパク質類としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン(KLH)、牛血清アルブミン(BSA)、卵白アルブミン、グロブリン、ポリリジンなどのポリペプチド、細菌菌体成分、例えばBCGなどが挙げられる。

【0016】2. 免疫原性抗原による動物の免疫  
動物を免疫するには、例えば村松繁、他編、実験生物学講座14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座12、分子免疫学III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。抗原と共に用いられるアジュバントとしては、例えばフロイント完全アジュバント、リビ(Ribi)アジュバント、百日咳ワクチン、BCG、リビッドA、リボソーム、水酸化アルミニウム、シリカなどが挙げられる。免疫は、例えばBALB/cなどのマウスをはじめとする動物を使用して行われる。抗原の投与量は、例えばマウスに対して約1~400 $\mu$ g/動物で、一般には宿主動物の腹腔内や皮下に注射し、以後1~4週間おきに、好ましくは1~2週間ごとに腹腔内、皮下、静脈内あるいは筋肉内に追加免疫を2~10回程度反復して行う。免疫用のマウスとしてはBALB/c系マウスの他、BALB/c系マウスと他系マウスとのF1マウスなどを用いることもできる。必要に応じ、抗体価測定系を調製し、抗体価を測定して動物免疫の程度を確認できる。

【0017】3. ミエローマ細胞(骨髓腫細胞)の調製  
細胞融合に使用される無限増殖可能株(腫瘍細胞株)としては免疫グロブリンを産生しない細胞株から選ぶことができ、例えばP3-NS-1-Ag4-1(NS-1, Eur. J. Immunology, 6, 511-519, 1976)、SP2/O-Ag14(SP2, Nature, 276, 269-270, 1978)、マウスミエローマMOPC-21セルライン由来のP3-X63-Ag8-U1(P3U1, Current topics in Microbiol. and Immunol., 81, 1-7, 1978)、P3-X63-Ag8(X63, Nature, 256, 495-497, 1975)、P3-X63-Ag8-653(653, J. Immunol., 123, 1548-1550, 1979)などを用いることができる。8-アザグアニン耐性のマウスミエローマ細胞株はダルベッコMEM培地(DMEM培地)、RPMI-1640培地などの細胞培地に、例えばペニシリン、アミカシンなどの抗生物質、牛胎児血清

11

(FCS)などを加え、さらに8-アザグアニン(例えば5~45 $\mu$ g/ml)を加えた培地で継代されるが、細胞融合の2~5日前に正常培地で継代して所要数の細胞株を用意することができる。また使用細胞株は、凍結保存株を約37℃で完全に解凍したのちRPMI-1640培地などの正常培地で3回以上洗浄後、正常培地で培養して所要数の細胞株を用意したものであってもよい。

【0018】4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合

上記2.の工程に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2~5日後にその脾臓が摘出され、脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所のリンパ節細胞を得て、それを細胞融合に使用することもできる。こうして得られた脾細胞懸濁液と上記4.の工程に従い得られたミエローマ細胞株を、例えば最小必須培地(MEM培地)、DMEM培地、RPMI-1640培地などの細胞培地中に置き、細胞融合剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。細胞融合剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、この様なものとしては不活性化したセンダイウイルス(HVJ: Hemagglutinating virus of Japan)などが挙げられる。好ましくは、例えば30~60%のポリエチレングリコールを0.5~2ml加えることができ、分子量が1,000~8,000のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が1,000~4,000のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30~60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどを少量加え、融合を促進することもできる。融合に使用する脾細胞(リンパ球):ミエローマ細胞株の割合は、例えば1:1~20:1とすることが挙げられるが、より好ましくは4:1~7:1とすることができる。融合反応を1~10分間行い、次にRPMI-1640培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うこともできる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後選択用培地に移す。

【0019】5. ハイブリドーマ(融合細胞)の選択及びモノクローン化

選択用培地としては、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの培地、所謂HAT培地が挙げられる。選択培地交換の方法は、一般的には培養プレートに分注した容量と当容量を翌日加え、その後1~3日ごとにHAT培地で半量ずつ交換するというようにすることができるが、適宜これに変更を加えて行うこともできる。また融合後8~16日目には、アミノプテリンを除いた、所謂HT培地で1~4日ごとに培地交換をすることができ、フィーダーとして、例えばマウス胸腺

12

細胞を使用することもでき、それが好ましい場合がある。ハイブリドーマの増殖のさかんな培養ウェルの培養上清を、例えば放射免疫分析(RIA)、ELISA、蛍光免疫分析(FIA)などの測定系、あるいは蛍光惹起細胞分離装置(FACS)などで、各TIMPあるいは各ヒトMMP抗原あるいはその断片ペプチドを抗原として用いたり、あるいは標識抗マウス抗体を用いて目的抗体を測定するなどして、スクリーニングしたり分離する。目的抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングする。クローニングは、寒天培地中でコロニーをピック・アップするか、あるいは限界希釈法によりなされる。限界希釈法でより好ましく行うことができる。クローニングは複数回行うことが好ましい。

【0020】6. モノクローナル抗体の製造

得られたハイブリドーマ株は、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの適当な増殖用培地中で培養し、その培地上清から所望のモノクローナル抗体を得ることが出来る。大量の抗体を得るためには、ハイブリドーマを腹水化することが挙げられる。この場合ミエローマ細胞由来の動物と同系の組織適合性動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、例えばヌード・マウスなどに各ハイブリドーマを移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を回収して得ることが出来る。ハイブリドーマの移植に先立ち、プリスタン(2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン)などの鉱物油を腹腔内投与した後、ハイブリドーマを増殖させ、腹水を採取すればよい。腹水液はそのまま、あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してモノクローナル抗体として用いることができる。好ましくは、モノクローナル抗体を含有する腹水は、硫酸分画した後、DEAE-セファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロテインAカラムの如きアフィニティ・カラムなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくは抗原又は抗原断片(例えば合成ペプチド、組換え抗原タンパク質あるいはペプチド、抗体が特異的に認識する部位など)を固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、プロテインAを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0021】こうして得られたモノクローナル抗体は、市販のアイソタイプ特異的抗マウスIg抗体、例えばアイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIg抗体などを用いてその抗体構成鎖の重鎖及び軽鎖のタイプについて調べることができる。モノクローナル抗体は、また特開平6-300757号及びClin. Chim. Acta (J. Zhang et al., 219, 1-14, 1993)記載の方法で調製されたもの、例えば該文献

記載のクローン78-12G8(微工研受託番号FERM P-13115)からのモノクローナル抗体、特開平6-213888号及びClin. Chim. Acta (N. Fujimoto et al., 221, 91-103, 1993)記載の方法で調製されたもの、例えば該文献記載のクローン75-7F7(微工研受託番号FERM P-13335)からのモノクローナル抗体、Clin. Chim. Acta (N. Fujimoto et al., 231, 79-88, 1994)記載の方法で調製されたもの、例えば該文献記載のクローン73-18B3(微工研受託番号FERM P-13695)からのモノクローナル抗体などであることができる。この各MMPに対し特異的に結合するモノクローナル抗体は、各MMPの潜在型及び活性型を認識するものが好ましいものとして挙げられる。

【0022】またこうして大量に得られた抗体の配列を決定したり、ハイブリドマ株から得られた抗体をコードする塩基配列を利用して、遺伝子組換え技術により抗体を作製することも可能である。さらにこれら抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られるFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>といった抗体フラグメントにして使用してもよい。これらフラグメントは、CM-又はDEAE-セルロースクロマトグラフィー、ゲルろ過及びアフィニティクロマトグラフィーなどの方法で精製できる。標識物を付与する抗体としては、IgG画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部Fab'を用いることができる。これらの場合の標識物の例としては、下記するように酵素(ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼあるいはβ-D-ガラクトシダーゼなど)、化学物質、蛍光物質あるいは放射性同位元素などがある。

【0023】本発明では、こうして得られた各MMPに対し特異的に結合するモノクローナル抗体とTIMPsを組合わせて用いて検体試料中の遊離の各活性型MMPを免疫学的に分別して定量する方法が提供される。さらにこうして得られた各MMPに対し特異的に結合するモノクローナル抗体とTIMPsあるいは各TIMPに対し特異的に結合するモノクローナル抗体を結合させたTIMPsとを組合わせて用いて検体試料中の遊離の各活性型MMPを免疫学的に分別して定量する方法が提供される。特に各TIMPを特異的に認識するモノクローナル抗体としては、TIMP-1を特異的に認識するモノクローナル抗体、TIMP-2を特異的に認識するモノクローナル抗体が挙げられる。特開平5-244985号の記載に従い調製し、得られた抗体が挙げられるが、そのうち特異性が高く且つ親和性の強いマウス抗TIMP-2 IgG(クローン67-4H11、微工研受託番号FERM P-12690)あるいはそれと実質的に同様の特異性を持つものなどが挙げられる。各MMP

を特異的に認識するモノクローナル抗体としては、各MMPの少なくとも活性型を認識するモノクローナル抗体が用いられ、各MMPの中央領域を特異的に認識するモノクローナル抗体、各MMPのカルボキシル末端領域を認識するモノクローナル抗体が挙げられる。各TIMPと各TIMPを特異的に認識し且つ標識化されたモノクローナル抗体は、活性型MMPsとの反応前に相互に結合されていてよい。その結合は架橋結合などの比較的安定で、各TIMPの各MMPに対する反応性に比較的影響しない方法が挙げられる。より強い結合形態にある場合には、潜在型MMP-2あるいは潜在型MMP-9との反応において各TIMPと各TIMPを特異的に認識し且つ標識化されたモノクローナル抗体との間の解離の問題などがなくより好ましい。その結合は上記免疫原性コンジュゲートに適用される方法、下記標識化に用いる方法、固相化に用いる方法などの中から適宜選択して用いることができる。好ましくはホルムアルデヒドなどのアルデヒド類を架橋剤として使用する方法が挙げられるが、これには限定されない。

【0024】さらに本発明では、各MMPに対し特異的に結合するモノクローナル抗体と、TIMPsに特異的に結合する抗体とTIMPsとの複合体を用いて、検体試料中の遊離の各活性型MMPを免疫学的に分別して定量する方法も提供される。特にTIMP-1を特異的に認識するモノクローナル抗体あるいはTIMP-2を特異的に認識するモノクローナル抗体とTIMPsとの複合体を標識試薬として用い、各MMPに対し特異的に結合するモノクローナル抗体を固相化試薬として用いて検体試料中の遊離の各活性型MMPを免疫学的に分別して定量する方法が好ましく提供される。糖が結合しているMMPsは、糖鎖などにより分子量にバラツキを生じたり、研究者により報告される測定分子量も異なる。したがって本発明では実質的に遊離のMMPの活性型を測定するものであればとくにその分子量は限定されるものではない。MMPsは、大きく分けてプロペプチド(propeptide)、触媒活性ドメイン(catalytic domain)、ヒンジ領域(hinge region)及びペキシン様ドメイン(pexin-like domain)の4つの領域に分けられ、プロペプチド領域をアミノ末端領域、ペキシン様ドメイン領域をカルボキシル末端領域とされ、その間の触媒活性ドメイン及びヒンジ領域を中央領域とされるのが一般的である。

【0025】本発明の測定は、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、ラジオイムノメトリックアッセイ、ELISAなどを用いることができ、B-F分離を行ってもあるいは行わないでその測定を行うことができる。各TIMPは直接検出可能に標識化されてもよいし、アッセイ反応前に各TIMPに対し特異的に結合する検出可

能に標識化されたモノクローナル抗体でもって間接的に検出可能に標識化されていてよい。一方各MMPに対する抗体を固相に固定化する。別の態様ではTIMPsを固相に固定化することもでき、この場合各MMPに対する抗体は検出可能に標識化されていてよい。検体と標識化TIMPs及び固相化抗体を必要に応じ順次反応させるためインキュベーション処理し、ここで非結合TIMPsを分離後、標識物を測定する。測定された標識の量は抗原、すなわち各活性型MMPの量と比例する。洗浄、攪拌、震盪、ろ過あるいは抗原の予備抽出等は、特定の状況のもとでそれら測定工程の中で適宜採用される。特定の試薬、緩衝液等の濃度、温度あるいはインキュベーション処理時間などのその他の測定条件は、検体中の抗原の濃度、検体試料の性質等の要素に従い変えることができる。当業者は通常の実験法を用いながら各測定に対して有効な最適の条件を適宜選定して測定を行うことができる。

【0026】固相化するための担体としては、抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、本発明ではそれらから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使用されるものが種々知られており、本発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、例えば活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、シリカアルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれらを乳化重合して得られたもの、細胞、赤血球などで、必要に応じ、シランカップリング剤などで官能性基を導入してあるものが挙げられる。さらに、ろ紙、ビーズ、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは扁平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質（物体）の表面などが挙げられる。これら担体へは、抗体を結合させることができ、好ましくはMMPに対し特異的に結合する各モノクローナル抗体を結合させることができる。担体とこれら抗原抗

体反応に関与するものとの結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことができる。

【0027】標識としては、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、放射性物質などを挙げることができる。酵素としては、脱水素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシ基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えばエステル結合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げることができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば酵素的サイクリングを利用することもできる。

【0028】代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、大腸菌 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、マレークト・デヒドロゲナーゼ、グルコース-6-フォスフェート・デヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリ・フォスファターゼなどが挙げられる。アルカリホスファターゼを用いた場合、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどのウンベリフェロン誘導体、ニトロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノール誘導体、NADPを利用した酵素的サイクリング系、ルシフェリン誘導体、ジオキセタン誘導体などの基質を使用したりして、生ずる蛍光、発光などにより測定できる。ルシフェリン、ルシフェラーゼ系を利用したりすることもできる。カタラーゼを用いた場合、過酸化水素と反応して酸素を生成するので、その酸素を電極などで検知することもできる。電極としてはガラス電極、難溶性塩膜を用いるイオン電極、液膜型電極、高分子膜電極などであることもできる。酵素標識は、ビオチン標識体と酵素標識アビジン（ストレプトアビジン）に置き換えることも可能である。標識は、複数の異なった種類の標識を使用することもできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うことを可能にすることもできる。

【0029】本発明においては、信号の形成に4-ヒドロキシフェニル酢酸、1, 2-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ、ウンベリフェリルガラクトシド、ニトロフェニルガラクトシドなどと $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、グルコ

ースー6ーリン酸・デヒドロゲナーゼなどの酵素試薬の組合わせも利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンのキノール化合物、リボ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるものが使用できる。

【0030】蛍光物質あるいは化学ルミネッセンス化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート、例えばローダミンBイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどのローダミン誘導体、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスサミン、フィコビリプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ビリジリジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。例えば、 $\text{NaIO}_4$  を用いた架橋法（例えば、1-フルオロー-2, 4-ジニトロベンゼンなどでアミノ基を保護した後、 $\text{MeNaIO}_4$  で酸化し、次に抗体などのタンパク質を反応させた後  $\text{NaBH}_4$  により還元する方法よりなっている）なども挙げられる。また上記免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。

【0031】縮合剤としては、例えばグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N, N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、p-ベンゾキノン、N, N'-o-フェニレンジマレイミド、N, N'-エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシニミジルスクシネート、ビスアゾベンジジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、スクシニミジル 3-(2-ビリジリジチオ)プロピオネート (SPDP)、N-スクシニミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート (SMCC)、N-スルホスクシニミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート、N-スクシニミジル (4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート、N-スクシニミジル 4-(1-マレイミドフェニル)ブチレート、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド (EMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物 (AMSA)、メチル-3-(4'-ジチオビリジリ)プロピオンイミデート、メチル-4-メルカプトブチリルイミデート (MMBI)、メチル-3-メルカプトプロピオンイミデート、N-スクシニミジル-

S-アセチルメルカプトアセテートなどが挙げられる。

【0032】本発明の測定法によれば、測定すべき物質を担体に結合されたTIMPあるいは抗体と、酵素などで標識した抗体試薬あるいは酵素などで標識したTIMP試薬に順次反応させることができるし、それらを同時に反応させることもできる。試薬を加える順序は選ばれた担体系の型により異なる。感作されたプラスチックなどのビーズを用いた場合には、該感作されたプラスチックなどのビーズを測定すべき物質を含む検体試料と共に最初適当な試験管中に一緒に入れ、その後酵素などで標識したモノクローナル抗体試薬あるいはTIMP試薬を加えることにより測定を行うことができる。本発明の定量法においては、免疫学的測定法が用いられるが、その際の固相担体としては、抗体などタンパク質を良く吸着するポリスチレン製、ポリカーボネイト製、ポリプロピレン製あるいはポリビニル製のボール、マイクロプレート、スティック、微粒子あるいは試験管などの種々の材料および形態を任意に選択し、使用することができる。測定にあたっては至適pH、例えばpH約4~9に保つように適当な緩衝液中で行うことができる。特に適切な緩衝剤としては、例えばアセテート緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、フォスフェート緩衝剤、トリス緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ボレート緩衝剤、グリシン緩衝剤、炭酸塩緩衝剤、トリス-塩酸緩衝剤などが挙げられる。緩衝剤は互いに任意の割合で混合して用いることができる。抗体抗原反応は約0℃~60℃の間の温度で行うことが好ましい。

【0033】酵素などで標識した抗体試薬、酵素などで標識したTIMP試薬、担体に結合せしめられた抗体試薬及び担体に結合せしめられたTIMP試薬、さらには測定すべき物質のインキュベーション処理は、平衡に達するまで行うことができるが、抗体抗原反応の平衡が達成されるよりもずっと早い時点で固相と液相とを分離して限定されたインキュベーション処理の後に反応を止めることができ、液相又は固相のいずれかにおける酵素などの標識の存在の程度を測ることができる。測定操作は、自動化された測定装置を用いて行うことが可能であり、ルミネッセンス・ディテクター、ホト・ディテクターなどを使用して基質が酵素の作用で変換されて生ずる表示シグナルを検知して測定することもできる。

【0034】抗体抗原反応及び活性型MMPsとTIMPsとの反応においては、それぞれ用いられる試薬、測定すべき物質、さらには酵素などの標識を安定化した、抗体抗原反応及び活性型MMPsとTIMPsとの反応自体を安定化するように適切な手段を講ずることができる。さらに、非特異的な反応を除去し、阻害的に働く影響を減らしたり、あるいは測定反応を活性化したりするため、タンパク質、安定化剤、界面活性剤、キレート化剤などをインキュベーション溶液に加えることもできる。当該分野で普通に採用されていたりあるいは



当業者に知られた非特異的結合反応を防ぐためのブロッキング処理を施してもよく、例えば、哺乳動物などの正常血清タンパク質、アルブミン、スキムミルク、乳発酵物質、コラーゲン、ゼラチンなどで処理することができる。非特異的結合反応を防ぐ目的である限り、それらの方法は特に限定されず用いることが出来る。本発明の測定方法で測定される試料としては、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液などが使用しうるが、好ましくは生物由来の流体試料、例えば血液、血漿、血清、関節液、脳脊髄液、唾液、羊水、尿、その他の体液、細胞培養液、組織培養液、組織ホモジネートなどが挙げられる。特に好ましくは血漿、血清、関節液、唾液、細胞培養液、組織培養液、組織ホモジネートなどが挙げられる。本発明に従えば、MMPs活性が亢進する病態、例えば関節症、癌、転移性癌、歯周病などの患者あるいは動物体液中の遊離の活性型MMPsを本発明に係る定量法を用いて定量することにより、上記疾患群の診断あるいはモニターに応用することができる。

#### 【0035】

【実施例】以下に実施例を挙げ、本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されること無く様々な態様が含まれることは理解されるべきである。

#### 実施例1 TIMPsの調製

TIMP-1は、ウシ未萌出知歯の根部歯髄を最小必須Eagle培地(日水製薬)中で培養し、ウシ歯髄由来細胞の培養液からカラムクロマトグラフィーにかけ精製した。例えばKodama et al., Collagen Rel. Res., 7, 341-350, 1987の方法に従い、各種材料から調製した。またTIMP-2はFujimoto et al. (Clin. Chim. Acta, 220, 31-45, 1993及び特開平6-300757号公報)の方法に従い、各種材料から調製した。例えば胎盤を細切後緩衝液中で攪拌し、得られた上清を抗TIMP-2モノクローナル抗体(例えば特開平5-244985号公報に開示のクローンNo. 67-4H11など)結合セファロース4Bカラムのクロマトグラフィーにかけて処理し、必要に応じ限外ろ過、ゲルろ過、例えばUltrogel AcA54(LKB)などで処理し、精製ヒトTIMP-2を調製した。

【0036】リコンビナントTIMP-1(rTIMP-1)はヒト正常歯肉線維芽細胞(ヒトGin-1細胞)などから得られた全RNA画分よりオリゴ(dT)-セルロースカラムを用いて、ポリA<sup>+</sup> mRNA画分を分離し、これを鋳型にしてcDNAを逆転写酵素を用いて調製し、Docherty et al., Nature, 318, 66-69, 1985などで知られたTIMP-1 cDNAの配列を参考にPCRプライマーを作成し、このPCRプライマー(プライマーTIF1: 5'-ATGGCCCCCTTTGAGCCCCCTG-

3'及びプライマーTIR1: 5'-CAGGATTCAGGCTATCTG-3')を用いてPCR法によりTIMP遺伝子を増幅し、得られたDNA断片をプラスミドPEX, pMEMneoなどのベクターに組込み、大腸菌、CHO細胞などで発現させて得ることができる。rTIMP-1は、特開平5-199868号記載の方法に従い得られた。調製されたrTIMP-1は、SDS-PAGE(12%均一ゲル、還元条件)で約30kDaの単一のバンドとして認められ、ウエスタンブロットリング(ペルオキシダーゼ標識マウス抗TIMP-1モノクローナル抗体で染色)においても約30kDaの単一のバンドとして認められたものであった。rTIMP-1のヒト線維芽細胞(CCD-41SK細胞)由来MMP-1に対する阻害活性は、IC<sub>50</sub>が約1×10<sup>-9</sup>Mであった。

【0037】またリコンビナントTIMP-2(rTIMP-2)は、ヒトGin-1細胞などから得られた全RNA画分よりオリゴ(dT)-セルロースカラムを用いてポリA<sup>+</sup> mRNA画分を分離し、これを鋳型、オリゴdT(15~18個)をプライマーにしてcDNAを逆転写酵素を用いて調製し、Boone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 87, 2800-2804, 1990などで知られたTIMP-2 cDNAの配列を参考に作成したプライマーT2F7; AAAGTCGACCATGGGCGCGCGGCCCGCACCCCT及びプライマーT2R5; TTAAGATCTGTCTGACTTAAGGATCCTCGATATCGAGGAATTCTTGCを用いてPCR法によりTIMP-2遺伝子を増幅し、得られたDNA断片をプラスミドpKGなどのベクターに組込み、CHO細胞などで発現させて得ることができる。rTIMP-2は、Aokiら(Connective Tissue, 1994, in press)の方法に従い調製した。抗TIMP-2モノクローナル抗体結合セファロース4Bカラムのクロマトグラフィーにかけて処理し、必要に応じ限外ろ過、ゲルろ過などで処理し、精製rTIMP-2を調製した。調製されたrTIMP-2は、SDS-PAGE(12%均一ゲル、還元条件)で約24kDaの単一のバンドとして認められ、胎盤から調製された天然型TIMP-2と同じ分子量の位置に認められた。エヒトープの異なる抗ヒトTIMP-2モノクローナル抗体(特開平5-244985号公報)によるウエスタンブロットリングを行った結果、約24kDaの位置に単一のバンドとして認められたものであった。CCD-41SK細胞由来MMP-1に対する阻害活性は、IC<sub>50</sub>が約1.1×10<sup>-9</sup>Mであった。またN末端及びC末端構造解析の結果、得られたrTIMP-2は、天然型TIMP-2と同一の物質であることが示唆された。ここでは、MMPs活性を阻害するTIMPsであればどのようなTIMPsでも使用できる

が、人為的に作成したrTIMPsを使用した。

#### 【0038】実施例2 標識TIMPsの調製

通常、タンパク質の標識物として低分子の放射性同位元素、化学物質あるいは蛍光物質がタンパク質自身を持っている活性を損なうことを避けるために用いられるが、ここでは一般的には、TIMPに対してはそのタンパク質自身の活性を損なう恐れが高い高分子の酵素で標識する方法を示す。

(a) rTIMPsあるいはIgG-ペルオキシダーゼ(HRP)複合体の調製

##### 1) SH基標識rTIMPあるいはSH基標識IgGの調製

rTIMP-1、rTIMP-2あるいはIgGを0.1Mリン酸緩衝液(pH6.5)に対し透析し、その溶液1mlに含有されている各々のrTIMPに対して100倍モルのAMSAをジメチルホルムアミド溶液として加え、30℃、30分間インキュベーションした。次に0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.0)100μl、0.1Mエチレンジアミン四酢酸塩(EDTA, pH6.0)10μl、1Mヒドロキシルアミン溶液(pH7.0)100μlを加え、30℃、5分間静置後、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したセファデックスG-25でゲルろ過し、SH基標識rTIMP-1、SH基標識rTIMP-2あるいはSH基標識IgGをそれぞれ得た。

##### 【0039】2) マレイミド標識HRPの調製

HRPを12mg/mlの濃度になるように0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解し、そのHRP量に対して25倍量のEMCSをジメチルホルムアミド溶液として加え、30℃、30分間反応させた。この反応液を0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したセファデックスG-25でゲルろ過し、マレイミド標識HRP画分を分取した。

##### 【0040】3) rTIMP-HRPあるいはIgG-HRP複合体の調製

上記1)で調製したSH基標識rTIMP-1、SH基標識rTIMP-2あるいはSH基標識IgG 1モルに上記2)で得られたマレイミド標識HRPを各々3モル、3モルあるいは5モル加え、4℃、24時間静置した。これらの混合液を0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.0)もしくは0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したUltrogel AcA 44カラムでゲルろ過し、rTIMP-1-HRP、rTIMP-2-HRPあるいはIgG-HRP複合体画分をそれぞれ分取した。得られた標識rTIMP-1及び標識rTIMP-2についてHRPの標識の程度をHRP活性を指標に比色法で調べた。反応させる上記2)で得られたマレイミド標識HRPの量を増加させることにより、結合HRPの量は増加することが確かめられたが、rTIMP-1あるいはrTIMP-2 1モル当りHRP

が各々1.8あるいは1.6結合したものが、以下の測定に用いる試薬としてより好ましいと判断した。

【0041】(b) rTIMP-IgG-HRPの調製  
rTIMPをHRPで標識する際、rTIMPに特異的に結合する物質を介してrTIMPを間接的にHRPで標識することができる。rTIMPに特異的に結合する物質としては、ここではTIMPに特異的に結合するモノクローナル抗体を使用した。ヒトTIMP-2ポリペプチドあるいは天然型TIMP-2を免疫原として調製されたモノクローナル抗体を使用できる。Boone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2800-2804, 1990に記載のcDNAから予測されるアミノ酸配列から三種のポリペプチド、例えばP-1; DSGNDIYGNPIKRIQC、P-2; DTLSTTQKKSLNHRVYQQC及びP-3; YRGAAPPKQEFLLDIEDCを合成し、これらを免疫原としてマウスを免疫し、免疫マウスからの脾細胞を用い細胞融合法で作成されたハイブリドマクロンから得られるモノクローナル抗体を用い、マレイミド標識HRPを反応させて抗TIMP-2モノクローナル抗体-HRPを得ることができる。こうした抗体としては潜在型MMP-2がTIMP-2に結合することを阻害することのできる抗体が好ましく使用される。TIMP-2のカルボキシル末端領域を認識する抗体が使用できる。

【0042】こうしてTIMP-2のカルボキシル末端領域のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を特開平5-244985号の記載に従い調製し、得られた抗体のうち、特異性が高く且つ親和性の強いマウス抗TIMP-2 IgG(クローン67-4H11、微工研受託番号FERM P-12690)を選択し、それを用い前記(a)項記載にしたがってHRPを標識した。このIgG-HRP(100μg)溶液にrTIMP-2 20μgを加え、10℃、3時間静置反応させた。この混合液にさらに最終濃度4%となるようにホルムアルデヒドを加え(固定反応)、室温で2時間反応させた。使用した抗TIMP-2 IgG(クローン67-4H11)はTIMP-2のカルボキシル末端領域を認識する抗体で、潜在型MMP-2によりTIMP-2-抗TIMP-2 IgGの結合が解離されることがわかっている(N. Fujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 220, 31-45, 1993)。

【0043】上記固定反応は、形成された免疫複合体(rTIMP-2-IgG-HRP)が潜在型MMP-2により解離しないようにするために、室温、0.5~6時間反応を行った結果、反応2時間が最良の条件であった。固定反応後、セファデックスG-25でホルムアルデヒドを除いた。この複合体は、潜在型MMP-2により解離せず、rTIMP-2とIgGが固定されてい

ることを確認した。このことより調製したrTIMP-2-IgG-HRPはそのrTIMP-2の潜在型MMP-2への結合領域が抗TIMP-2 IgGでブロックされたため、潜在型MMP-2と反応しないことが示された。すなわち上記rTIMP-2-IgG-HRPはすべての活性型MMPsと反応し、さらに潜在型MMP-2と活性型MMP-2の分別を可能にした。rTIMP-2をrTIMP-1に代え、上記と同様の方法でrTIMP-1-IgG-HRPも調製できた。抗ヒトTIMP-1モノクローナル抗体は、実施例1のよう

にして得られた精製TIMP-1を免疫原としてマウスを免疫し、免疫マウスからの脾細胞を用い細胞融合法で作成されるハイブリドマクローンから得られる。Kodama et al., Collagen Rel. Res., 7, 341-350, 1987記載のマウス抗TIMP-1 IgGから選んで使用される。  
【0044】実施例3 モノクローナル抗体の選択  
抗ヒトMMP-1モノクローナル抗体は、ヒトプロMMP-1を免疫原としてマウスを免疫し、免疫マウスからの脾細胞を用い細胞融合法で作成されるハイブリドマクローンから得られる。精製ヒトプロMMP-1は、ヒト正常皮膚線維芽細胞CCD-41SK (ATCC No. CRL1505)を10%FCS含有最小必須Eagle培地中で培養し、必要に応じてインターロイキン1 $\alpha$ で細胞刺激して得られた細胞培養上清から、限外ろ過(東洋濾紙UP-76)による濃縮、ヘパリンセファロースCL-6Bカラム(Pharmacia Fine Chemicals)、セファクリルS-200(Pharmacia Fine Chemicals)、グリーンA アクチゲルALDカラム(Stegrogene)などによりクロマトグラフィーにかけ精製した。得られた抗ヒトMMP-1モノクローナル抗体のうち、少なくとも活性型MMP-1を認識する抗体を使用することができる。抗ヒトMMP-1モノクローナル抗体は、特開平6-300757号及びClin. Chim. Acta, 219, 1-14, 1993記載のモノクローナル抗体のうち、クローン78-12G8

(微工研受託番号FERM P-13115)からの抗体を選んだ。この抗体は潜在型及び活性型MMP-1を認識し、EDTAなどのキレート剤によってはその免疫反応性の変化が認められないという性質をもっている。

【0045】抗ヒトMMP-2モノクローナル抗体は、CCD-41SK細胞をヒトプロMMP-1の場合と同様にして処理し、得られた細胞培養上清からゼラチンアガロース、抗TIMP-2 IgG結合セファロース、抗フィブロネクチンIgG結合セファロースなどによりクロマトグラフィーにかけ精製されるヒトプロMMP-2を免疫原としてマウスを免疫し、免疫マウスからの脾細胞を用い細胞融合法で作成されるハイブリドマクローンから得られる。得られた抗ヒトMMP-2モノクロー

ーナル抗体のうち、少なくとも活性型MMP-2を認識する抗体を使用することができる。抗ヒトMMP-2モノクローナル抗体は、特開平6-213888号及びFujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 221, 91-103, 1993に記載のモノクローナル抗体のうち、親和性の強いクローン75-7F7(微工研受託番号FERM P-13335)からの抗体を使用した。この抗体は、MMP-2のカルボキシル末端領域を認識し、潜在型及び活性型MMP-2を認識する抗体である。

【0046】抗ヒトMMP-7モノクローナル抗体は、ヒト直腸癌細胞由来CaR-1細胞の培養液から、J. Biol. Chem., 261, 14245-14255, 1986及びJ. Biol. Chem., 267, 21712-21719, 1992に記載のOkada et al.の方法に従い精製したヒトMMP-7を、さらにDEAE-セルロースカラム、Green A Dyematrixgel (Amicon製)カラム、亜鉛キレートセファロース(Pharmacia製)カラム、ウルトロゲルAcA44 (IBF Biotechnics製)カラムなどで処理し、得られたヒトプロMMP-7を抗原として用いてBALB/c雌マウスを免疫し、こうして免疫されたマウスから採取した脾臓細胞を8-アザグアニン耐性ミエロマ細胞SP2 (SP2/0-Ag14)と細胞融合させ、ハイブリドマを選択し、クローニングして得られる。抗ヒトMMP-7モノクローナル抗体のうち、クローン125-20H11(生工研受託番号FERM P-14735)は、活性型MMP-7を認識する抗体である。

【0047】抗ヒトMMP-9モノクローナル抗体は、ヒト線維肉腫細胞(HT-1080細胞)を培養し、必要に応じてtumor necrosis factor- $\alpha$ で細胞刺激して得られた細胞培養上清から、限外ろ過、ゼラチンアガロースカラム、抗TIMP-1モノクローナル抗体結合セファロース4B、抗フィブロネクチン抗体結合セファロース4Bなどによりクロマトグラフィーにかけ精製して得られたヒトプロMMP-9を免疫原としてマウスを免疫し、免疫マウスからの脾細胞を用い細胞融合法で作成されるハイブリドマクローンから得られる。得られた抗ヒトMMP-9モノクローナル抗体のうち、少なくとも活性型MMP-9を認識する抗体を使用することができる。抗ヒトMMP-9モノクローナル抗体は、Fujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 231, 79-88, 1994に記載のモノクローナル抗体のうち、親和性の強いクローン73-18B3(微工研受託番号FERM P-13695)からの抗体を用いることにした。この抗体は、MMP-9の中央領域を認識し、潜在型及び活性型MMP-9を認識する抗体である。同様にMMP-3、-8、-10、-11、-12、-13及び-14

25

に対するそれぞれのモノクローナル抗体を調製し、適切なクローンを選択して使用できる。

#### 【0048】実施例4 活性型MMPsの調製

活性型MMP-1は、ヒト皮膚線維芽細胞(CCD-41SK)培養上清より精製した潜在型MMP-1を0.1M塩化ナトリウム、10mM塩化カルシウム含有50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)(緩衝液A)に溶解し、終濃度が1mMになるようにアミノフェニルマ-キユリッアセテート(APMA)を加え、37℃、2時間インキュベーションした(J. Zhang et al., Clin. Chim. Acta, 219, 1-14, 1993)。SDS-PAGE(12.5%ゲル、2-メルカプトエタノール存在下)によりヒト潜在型MMP-1は完全に活性型MMP-1へ活性化されたことを確認した。

【0049】活性型MMP-2は、CCD-41SK培養上清から精製した潜在型MMP-2を上記緩衝液Aに溶解し、1mM APMAで37℃、30分間インキュベーションすることにより得た(N. Fujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 221, 91-103, 1993)。SDS-PAGE上潜在型MMP-2が活性型MMP-2に活性化されたことを確認した。活性型MMP-7は、実施例3に記載のヒトプロMMP-7の調製の際、亜鉛キレートセファロース(Pharmacia製)カラムでの処理において1mM CaCl<sub>2</sub>、0.05% Brij 35、0.02% NaN<sub>3</sub>含有25mMカコジル酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)に溶解したNaClの濃度勾配により溶出すると、0.15M NaCl含有同緩衝液で溶出され得られた。

【0050】活性型MMP-9は、ヒト線維肉腫細胞HT1080培養上清から精製した潜在型MMP-9を緩衝液Aに溶解し、1mM APMAで37℃、24時間インキュベーションすることにより得た(Y. Okada et al., J. Biol. Chem., 267, 21712-21719, 1993)。SDS-PAGE上潜在型MMP-9が活性型MMP-9に活性化されたことを確認した。MMP-3(Y. Okada et al., Biochem. J., 254, 731-741, 1988)、MMP-8(V. Knauper et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler., 371, 295-304, 1990)、MMP-10(A. J. Park et al., J. Biol. Chem., 266, 1584-1590, 1991)、MMP-11(D. Pei et al., J. Biol. Chem., 269, 25849-25855, 1994)、MMP-12(S. D. Shapiro et al., J. Biol. Chem., 268, 23824-23829, 1993)、MMP-13(J. M. P. Freije et

26

al., J. Biol. Chem., 269, 16766-16773, 1994)、MMP-14(特願平6-331305号)についても各活性型MMPを調製して、同様にして使用できる。

#### 【0051】実施例5 活性型MMPsの定量法

##### (a)モノクローナル抗体結合担体の調製法

J. Immunoassay 4, 209-327, 1983に記載のIshikawa et al.の方法に従って、マウス抗ヒトMMPs IgG(クローンNo. 78-12G8、75-7F7あるいは73-18B3)を各々0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解し、100μg/mlの濃度に調製した。そのモノクローナル抗体溶液を96穴マイクロプレートにウエル当たり100μlずつ加え、4℃、24時間静置した。次にモノクローナル抗体溶液を除去し、各々0.1M塩化ナトリウム含有10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で2回洗浄後、1% BSA、0.1M塩化ナトリウム、10mM塩化カルシウム含有50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4、緩衝液B)に浸漬し、4℃で保存した。

##### 【0052】(b)活性型MMPsの定量法

MMPsのうちMMP-2及びMMP-9を除くすべてのMMPsはその潜在型がTIMPsと結合せず、遊離の活性型のみがTIMPsと結合するという共通の性質を有するためそれらはすべて同一原理で定量される。従って実施例として活性型MMP-1の定量法を代表例として記載した。また、MMP-2あるいはMMP-9については潜在型でも各々TIMP-2あるいはTIMP-1が結合するため、その潜在型との分別を行うために標識物を直接付与したTIMP-1あるいは標識物を間接的に付与したTIMP-2を使用した定量法を記載した。

##### 【0053】1)活性型MMP-1の定量法

実施例4に記載した活性型MMP-1を標準とし、既知濃度の活性型MMP-1あるいは遊離の活性型MMP-1を含む検体を96穴ビニルプレート(Falcon製)に各々20μl加えた。次に実施例2(a)項で調製したrTIMP-1-HRP複合体を5μg/mlとなるように緩衝液Bで希釈し、あるいは実施例2(b)項で調製したrTIMP-2-抗TIMP-2 IgG-HRP複合体を18μg/mlとなるように緩衝液Bで希釈し、上記ビニルプレートに各々100μlずつ加え混合した。この混合液を前記(a)項で調製した抗MMP-1抗体(クローンNo. 78-12G8)結合プレートに100μl加え、室温で2時間反応させ、生理食塩液で3回洗浄した。次に0.02%過酸化水素含有0.1Mクエン酸-リン酸緩衝液(pH4.9)に溶解した2mg/mlのo-フェニレンジアミンをウエル当たり100μl加え、室温で20分間反応後、2N硫酸100μlを添加し、反応を停止させた。この反応混合液の492nmにおける吸光度(A<sub>492</sub>)をマイクロプレ

ートリーダー (MPR-A4、東ソー) を用いて測定し、検量線を作成した (図1)。rTIMP-1-HRP複合体を用いた定量系の感度は、標準0 ng/ml値+2S. D. から5 ng/ml (84 pg/アッセイ) で、活性型MMP-1標準液20~640 ng/ml (0.33~10.7 ng/アッセイ) の範囲で直線性が認められた。rTIMP-2-IgG-HRP複合体を用いた定量法の感度は、1.3 ng/ml (22 pg/アッセイ) で、活性型MMP-1標準液4~330 ng/ml (67~5500 pg/アッセイ) の範囲で直線性が認められた。なお、rTIMP-2-HRP複合体を用いた定量法でも、rTIMP-1-HRP複合体を用いた定量法とほぼ同じ様な結果が得られた。

【0054】2) 活性型MMP-2の定量法  
実施例4に記載した活性型MMP-2を標準とし、既知濃度の活性型MMP-2あるいは遊離の活性型MMP-2を含む検体を96穴ビニルプレートに各々20μl加えた。次に実施例2(a)項で調製したrTIMP-1-HRP複合体を5μg/mlとなるように緩衝液Bで希釈し、上記ビニルプレートに各々100μlずつ加え混合した。この混合液を前記(a)項で調製したマウス抗MMP-2抗体(クローンNo. 75-7F7)結合プレートに加え、以下の操作は上記1)と同様に行った。検量線を図2に示した。この定量法の感度は標準0 ng/ml値+2S. D. から34 ng/ml (0.57 ng/アッセイ) であり、直線性は34~930 ng/ml (0.57~15.5 ng/アッセイ) の範囲で認められた。

【0055】3) 活性型MMP-9の定量法  
実施例4に記載した活性型MMP-9を標準とし、既知濃度の活性型MMP-9あるいは遊離の活性型MMP-9を含む検体を96穴ビニルプレートに各々20μl加えた。次に実施例2(b)項で調製したrTIMP-2-IgG-HRP複合体を18μg/mlとなるように緩衝液Bで希釈し、上記ビニルプレートに各々100μlずつ加え混合した。この混合液を前記(a)項で調製したマウス抗ヒトMMP-9抗体(クローンNo. 73-18B3)結合プレート100μlに加え、以下の操作は上記1)と同様に行った。検量線を図3に示した。この測定系の感度は標準0 ng/ml値+2S. D. から5 ng/ml (84 pg/アッセイ) であり、直線性は10~320 ng/ml (0.17~5.3 ng/アッセイ) の範囲で認められた。同様にしてMMP-3、-7、-8、-10、-11、-12、-13及び-14についてもそれぞれの活性型MMPを分別定量する。

【0056】実施例6 ヒト関節液中及びヒト血清中活

#### 性型MMPsの定量

検体として組織破壊の進行している慢性関節リウマチ(RA)及びコントロールとしての変形性関節症(OA)患者の関節液、及びヒト血清を用い、RA患者血清でレベルの上昇が認められているMMP-2(N. Fujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 221, 91-103, 1993)を実施例4(b)項2)に記載の方法でrTIMP-1-HRP及び抗MMP-2抗体を用いて遊離の活性型MMP-2を測定した。OA患者関節液及びヒト血清中の遊離の活性型MMP-2濃度は、すべてこの定量法の感度以下であった。一方、組織破壊の進行しているRA患者関節液中の遊離の活性型MMP-2濃度は、一部感度以下であったが、OA患者関節液及びヒト血清中の遊離の活性型MMP-2濃度よりも著しく高かった(図4)。OA患者関節液及びヒト血清中で活性型MMP-2は検出されなかったが、これら検体中には遊離状態のTIMPsが存在することが知られており、遊離状態の活性型MMPsが存在しないことと一致する。例として活性型MMP-2定量法の臨床応用例を示したが、その他にも組織破壊、炎症あるいは癌転移などの疾患をもつ患者からの細胞、組織ホモジネート、関節液、血液あるいは尿などにおいて、本定量法により遊離状態の活性型MMPsの分別定量が可能となる。

#### 【0057】

【発明の効果】本発明では、各MMPを特異的に認識することができるモノクローナル抗体と各TIMPを用いることにより遊離の各活性型MMPの免疫学的測定を達成できる。特に被検試料中の活性型MMPを認識するモノクローナル抗体と各TIMPとを用いることにより、遊離の各活性型MMPを測定することができ、その結果活性型MMPを感度ならびに精度良く、また迅速に定量し得る。そしてこうしてMMPの免疫学的測定を達成できることにより、慢性関節リウマチなどのような炎症性疾患、癌、腫瘍性疾患においても重要な働きをしていると考えられる各活性型MMPを精度良く且つ迅速に分別定量できるので、これら炎症反応の診断の道を開き、さらには慢性関節リウマチなどのような炎症性疾患、腫瘍性疾患、転移性癌などの診断剤として有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

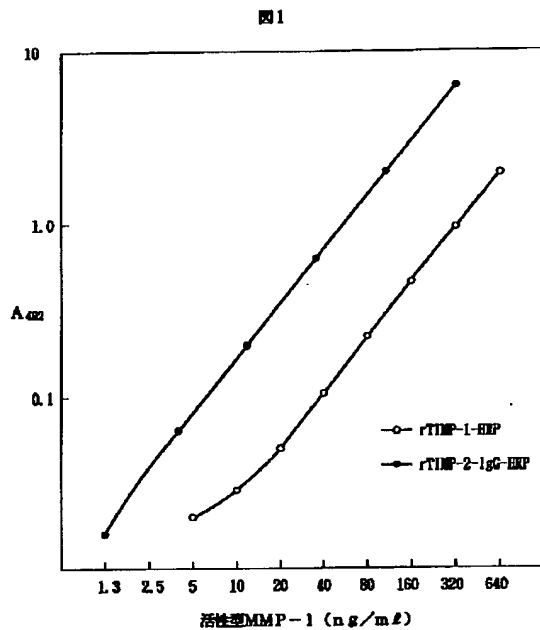
【図1】活性型MMP-1の標準曲線を示す図である。

【図2】活性型MMP-2の標準曲線を示す図である。

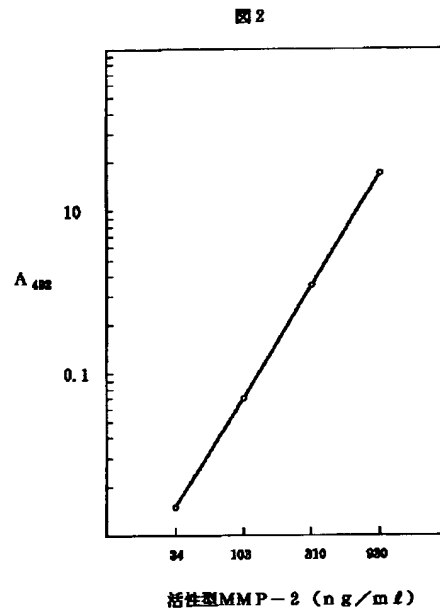
【図3】活性型MMP-9の標準曲線を示す図である。

【図4】RA患者、OA患者関節液あるいはヒト血清中の遊離の活性型MMP-2量を示す図である。

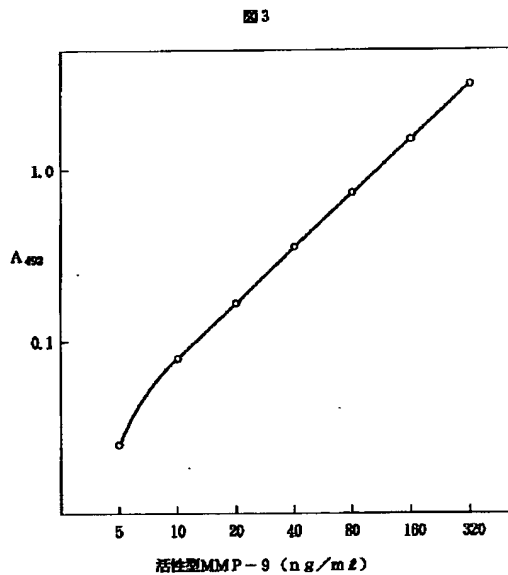
【図1】



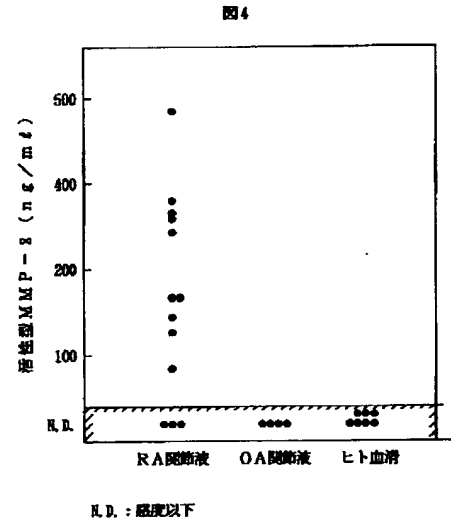
【図2】



【図3】



【図4】



## 【手続補正書】

【提出日】平成8年4月2日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項12

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【請求項12】マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとしてティッシュインヒビターオブメタロプロテアーゼ-1を、各マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体として

各マトリックスメタロプロテアーゼ分子の中央領域またはカルボキシル末端領域を認識する抗体を用い、遊離の活性型マトリックスメタロプロテアーゼ-1、-2、-3、-7、-8、-9、-10、-11、-12及び-13並びに遊離の活性型膜型マトリックスメタロプロテアーゼから成る群から選ばれたものを測定することを特徴とする請求項1記載の定量法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項13

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項13】 マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとしてティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼ-1を、各マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体として各ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ分子の中央領域またはカルボキシル末端領域を認識する抗体を用い、遊離のヒト活性型マトリックスメタロプロテアーゼ-1、-2、-3、-7、-8、-9、-10、-11、-12及び-13並びに遊離の活性型膜型マトリックスメタロプロテアーゼから成る群から選ばれたものを測定することを特徴とする請求項11又は12記載の定量法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項15

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項15】 マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとしてティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼ-2を、各マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体として各マトリックスメタロプロテアーゼ分子の中央領域またはカルボキシル末端領域を認識する抗体を用い、遊離の活性型マトリックスメタロプロテアーゼ-1、-2、-3、-7、-8、-9、-10、-11、-12及び-13並びに遊離の活性型膜型マトリックスメタロプロテアーゼから成る群から選ばれたものを測定することを特徴とする請求項14記載の定量法。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項16

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項16】 マトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターとしてティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼ-2を、各マトリックスメタロプロテアーゼに対し特異的に結合するモノクローナル抗体として各ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ分子の中央領域またはカルボキシル末端領域を認識する抗体を用い、遊

離のヒト活性型マトリックスメタロプロテアーゼ-1、-2、-3、-7、-8、-9、-10、-11、-12及び-13並びに遊離の活性型膜型マトリックスメタロプロテアーゼから成る群から選ばれたものを測定することを特徴とする請求項14又は15記載の定量法。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正内容】

【0002】

【背景技術】細胞外マトリックスは、コラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、フィブロネクチン及びラミニニンなどの接着性糖タンパク質から構成されている(Martinez-Hernandez et al., Lab. Invest., 48, 656-677, 1983)。これらマトリックス成分の分解にはマトリックスメタロプロテアーゼ類(MMPs)が重要な役割を果たしていることは周知のことである。知られているMMPの種類とそのナンバリングは以下のようになっている。間質型コラゲナーゼ(MMP-1)、72キログルトン(kDa)ゼラチナーゼ(MMP-2)、ストロムライシン-1(MMP-3)、PUMP-1(MMP-7)、好中球コラゲナーゼ(MMP-8)、92kDaゼラチナーゼ(MMP-9)、ストロムライシン-2(MMP-10)、ストロムライシン-3(MMP-11)、マクロファージメタロエラスターゼ(MMP-12)、コラゲナーゼ-3(MMP-13)及び膜型MMP(MT-MMP)である(H. Birkedal-Hansen et al., Oral Biol. Med., 4, 197-250, 1993; S. D. Shapiro et al., J. Biol. Chem., 268, 23824-23829, 1993; J. M. P. Freije et al., J. Biol. Chem., 269, 16766-16773, 1994; H. Sato et al., Nature, 370, 61-65, 1994)。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正内容】

【0005】

【課題の解決】本発明の目的は、簡単な操作及び試薬を用い、感度並びに精度良く、また迅速にそれぞれの活性型MMPs量を分別して定量し得る方法を提供することにある。こうした方法に用いる試薬キットを提供することも本発明の目的の一つである。本発明者らは、活性型MMPsに結合し、その活性を抑制するインヒビター、例えばTIMPs、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、ペプチド



インヒビター及び合成化合物などのうち、TIMPsがすべてのMMPsの活性型に特異的に結合することに着目し、各MMPに特異的に結合する抗体とTIMPsとの組合せにより簡便な遊離の活性型MMPsの分別定量法を提供できるのではないかと考えて、鋭意研究の結果、各MMPに特異的に結合する抗体と、TIMPsあるいはTIMPsと各TIMPに特異的に結合する抗体との複合物を組合せて使用する遊離の活性型MMPsの分別定量法を確立した。さらにTIMPsを標識付与として用いる場合、TIMPsの活性型MMPsに対する結合能を損することなく直接または間接的に標識物を付与することに成功し、この標識物を付与したTIMPsと各MMPに特異的に結合する抗体とを組合せることにより、簡便な遊離の活性型MMPsの分別定量法を確立した。特に直接標識物を付与したTIMP-1と各MMPに特異的に結合する抗体とを組み合わせる場合、遊離の活性型MMP-1、-2、-3、-7、-8、-10、-11、-12及び-13並びにMT-MMPを定量することができ、直接標識物を付与したTIMP-2と各MMPに特異的に結合する抗体とを組み合わせる場合、遊離の活性型MMP-1、-3、-7、-8、-9、-10、-11、-12及び-13並びにMT-MMPを定量することができる。さらに固相用にTIMP-1あるいはTIMP-2を用いる場合も上記と同様各々の遊離の活性型MMPsを定量することができる。

## 【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正内容】

【0006】またさらに各MMPに特異的に結合する抗体と各TIMPとを組み合わせる場合、標識物を付与した抗TIMP抗体を用いて間接的に標識物を付与した各TIMPを用いることにより、すべての遊離の活性型MMPs、すなわちMMP-1、-2、-3、-7、-8、-9、-10、-11、-12及び-13並びにMT-MMPを定量することができる。本発明は、TIMPsから成る群から選ばれたものと各MMPに対するモノクローナル抗体から成る群から選ばれたものとを組合せて用い、その組合せ成分の一方を直接あるいは間接に検知可能な標識物を付与した成分とし、他の組合せ成分を固相化した成分として用い、被検試料中の遊離の活性型MMPsを分別定量する方法及びその方法に用いる試薬を提供することにある。こうして典型的には本発明の目的は、上記の標識物を付与したTIMPs（各TIMPに対する標識物を付与した各モノクローナル抗体で間接的に標識物を付与したTIMPsを含む）あるいは各MMPに対するモノクローナル抗体及び固相担体用として各MMPに対するモノクローナル抗体

あるいはTIMPsを用い、被検試料中の遊離の活性型MMPsを分別定量する優れた方法及びそのための試薬キットを提供することにある。本発明はこうした遊離の活性型MMPsを分別定量することのできる試薬キットのうちの各試薬をすべてその実施態様のうちに含むと理解される。さらに本発明の目的は、上記定量法を用いて遊離の活性型MMPsを分別定量することにより、組織破壊や癌転移などの病態をモニターし得る方法並びに試薬あるいは診断剤を提供することにある。したがって、医学的生理学的分野における上記試薬の各種利用、組織破壊や癌転移、組織の修復の程度の判断、あるいは細胞増殖促進などの生理的作用の指標として上記試薬を使用することはすべて本発明のその実施態様のうちに含むと理解される。

## 【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

【0011】1. 免疫原性抗原の調製

抗原としては、例えばKodama et al., Collagen Rel. Res., 7, 341-350, 1987及びKodama et al., J. Immunol. Methods, 127, 103-108, 1990に記載の方法により調製したTIMP-1、Fujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 220, 31-45, 1993に記載の方法により調製したTIMP-2、特開平5-199868号に記載の方法に従い調製したリコンビナントTIMP-1 (rTIMP-1)、Aoki et al., Connective Tissue, 26, 281-290, 1995に記載の方法に従い調製したリコンビナントTIMP-2 (rTIMP-2) などを用いることができる。ここでは、MMPs活性を阻害するTIMPsであればどのTIMPsでも使用できる。

## 【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】また抗原としては、例えばZhang et al., Clin. Chim. Acta, 219, 1-14, 1993に記載の方法に従い調製したMMP-1、Fujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 221, 91-103, 1993に記載の方法に従い調製したMMP-2、Okada et al., Biochem. J., 254, 731-741, 1988に記載の方法に従い調製したMMP-3、Knauper et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler., 371, 295-3

04, 1990に記載の方法により調製したMMP-8, Okada et al., J. Biol. Chem., 267, 21712-21719, 1992に記載の方法に従い調製したMMP-9, Park et al., J. Biol. Chem., 266, 1584-1590, 1991に記載の方法に従い調製したリコンビナントMMP-10, Pei et al., J. Biol. Chem., 269, 25849-25855, 1994に記載の方法に従い調製したリコンビナントMMP-11, Shapiro et al., J. Biol. Chem., 268, 23824-23829, 1993に記載の方法に従い調製したMMP-12及びリコンビナントMMP-12, Freije et al., J. Biol. Chem., 269, 16766-16773, 1994に記載の方法に従い調製したリコンビナントMMP-13、特願平6-331305号に記載の方法に従い調製したMT-MMPなどで、それらの文献やそこで引用する文献に記載の方法に従い調製したMMPs、さらには遺伝子組み換え等によって得られたMMPsなどを用いることができる。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正内容】

【0013】ここでは、潜在型や活性型のものが好ましく使用できる。こうした抗原は、各種原料、例えば培養細胞、培養組織など、形質転換体細胞などの抗原産生材料から従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミド電気泳動、モノクローナル抗体などの抗原を特異的に認識する抗体あるいはインヒビターを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくはゼラチン-アガロース・アフィニティ・クロマトグラフィー、ヘパリン-アガロース・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正内容】

【0018】4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合

上記2. の工程に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2〜5日後にその脾臓が摘出され、脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所のリンパ節細胞を

得て、それを細胞融合に使用することもできる。こうして得られた脾細胞懸濁液と上記3. の工程に従い得られたミエローマ細胞株を、例えば最小必須培地(MEM培地)、DMEM培地、RPMI-1640培地などの細胞培地中に置き、細胞融合剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。細胞融合剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、この様なものとしては不活性化したセンダイウイルス(HVJ: Hemagglutinating virus of Japan)などが挙げられる。好ましくは、例えば30〜60%のポリエチレングリコールを0.5〜2ml加えることができ、分子量が1,000〜8,000のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が1,000〜4,000のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30〜60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどを少量加え、融合を促進することもできる。融合に使用する脾細胞(リンパ球): ミエローマ細胞株の割合は、例えば1:1〜20:1とすることが挙げられるが、より好ましくは4:1〜7:1とすることができる。融合反応を1〜10分間行い、次にRPMI-1640培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うこともできる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後選択用培地に移す。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正内容】

【0021】こうして得られたモノクローナル抗体は、市販のアイソタイプ特異的抗マウスIg抗体、例えばアイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIg抗体などを用いてその抗体構成鎖の重鎖及び軽鎖のタイプについて調べることができる。モノクローナル抗体は、また特開平6-300757号及びClin. Chim. Acta (J. Zhang et al., 219, 1-14, 1993)に記載の方法で調製されたもの、例えば該文献記載のクローン78-12G8(微工研受託番号FERM P-13115)からのモノクローナル抗体、特開平6-213888号及びClin. Chim. Acta (N. Fujimoto et al., 221, 91-103, 1993)に記載の方法で調製されたもの、例えば該文献記載のクローン75-7F7(微工研受託番号FERM P-13335)からのモノクローナル抗体、Clin. Chim. Acta (N. Fujimoto et al., 231, 79-88, 1994)に記載の方法で調製されたもの、例えば該文献記載のクローン73-18B3(生工研受託番号FERM P-13695)からのモノクローナル抗体などであることが

できる。この各MMPに対し特異的に結合するモノクローナル抗体は、各MMPの潜在型及び活性型を認識するものが好ましいものとして挙げられる。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】さらに本発明では、各MMPに対し特異的に結合するモノクローナル抗体と、TIMPsに特異的に結合する抗体とTIMPsとの複合体を用いて、検体試料中の遊離の各活性型MMPを免疫学的に分別して定量する方法も提供される。特にTIMP-1を特異的に認識するモノクローナル抗体あるいはTIMP-2を特異的に認識するモノクローナル抗体とTIMPsとの複合体を標識試薬として用い、各MMPに対し特異的に結合するモノクローナル抗体を固相化試薬として用いて検体試料中の遊離の各活性型MMPを免疫学的に分別して定量する方法が好ましく提供される。糖が結合しているMMPsは、糖鎖などにより分子量にバラツキを生じたり、研究者により報告される測定分子量も異なる。したがって本発明では実質的に遊離のMMPの活性型を測定するものであればとくにその分子量は限定されるものではない。MMPsは、大きく分けてプロペプチド(propeptide)、触媒活性ドメイン(catalytic domain)、ヒンジ領域(hinge region)及びペキシン様ドメイン(pexin-like domain)の4つの領域に分けられ、プロペプチド領域をアミノ末端領域、ペキシン様ドメイン領域をカルボキシル末端領域とされ、その間の触媒活性ドメイン及びヒンジ領域を中央領域とされるのが一般的である。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正内容】

【0037】またリコンビナントTIMP-2(rTIMP-2)は、ヒトGin-1細胞などから得られた全RNA画分よりオリゴ(dT)-セルロースカラムを用いてポリA<sup>+</sup>mRNA画分を分離し、これを鋳型、オリゴdT(15~18個)をプライマーにしてcDNAを逆転写酵素を用いて調製し、Boone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2800-2804, 1990などで知られたTIMP-2 cDNAの配列を参考に作成したプライマーT2F7; AAAGTCGACCATGGGCGCGCGGCCCGCACCCCT及びプライマーT2R5; TTAAGATCTGTCTGACTTAAGGATCCTCGATATCGAGGAATTCTTGCを用

いてPCR法によりTIMP-2遺伝子を増幅し、得られたDNA断片をプラスミドpKGなどのベクターに組み込み、CHO細胞などで発現させて得ることができる。rTIMP-2は、Aokiら(Connective Tissue, 26, 281-290, 1995)の方法に従い調製した。抗TIMP-2モノクローナル抗体結合セファロース 4Bカラムのクロマトグラフィーにかけて処理し、必要に応じ限外ろ過、ゲルろ過などで処理し、精製rTIMP-2を調製した。調製されたrTIMP-2は、SDS-PAGE(12%均一ゲル、還元条件)で約24kDaの単一のバンドとして認められ、胎盤から調製された天然型TIMP-2と同じ分子量の位置に認められた。エピトープの異なる抗ヒトTIMP-2モノクローナル抗体(特開平5-244985号公報)によるウエスタンブロッティングを行った結果、約24kDaの位置に単一のバンドとして認められたものであった。CCD-41SK細胞由来MMP-1に対する阻害活性は、IC<sub>50</sub>が約1.1×10<sup>-9</sup>Mであった。またN末端及びC末端構造解析の結果、得られたrTIMP-2は、天然型TIMP-2と同一の物質であることが示唆された。ここでは、MMPs活性を阻害するTIMPsであればどのようなTIMPsでも使用できるが、人為的に作成したrTIMPsを使用した。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正内容】

【0042】こうしてTIMP-2のカルボキシル末端領域のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を特開平5-244985号の記載に従い調製し、得られた抗体のうち、特異性が高く且つ親和性の強いマウス抗TIMP-2 IgG(クローン67-4H11、微工研受託番号FERM P-12690)を選択し、それを用い前記(a)項記載にしたがってHRPを標識した。このIgG-HRP(100μg)溶液にrTIMP-2 20μgを加え、10℃、3時間静置反応させた。この混合液にさらに最終濃度4%となるようにホルムアルデヒドを加え(固定反応)、室温で2時間反応させた。使用した抗TIMP-2 IgG(クローン67-4H11)はTIMP-2のカルボキシル末端領域を認識する抗体で、潜在型MMP-2によりTIMP-2-抗TIMP-2 IgGの結合が解離されることがわかっている(N. Fujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 220, 31-45, 1993)。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0047

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0047】抗ヒトMMP-9モノクローナル抗体は、ヒト線維肉腫細胞（HT-1080細胞）を培養し、必要に応じtumor necrosis factor- $\alpha$ で細胞刺激して得られた細胞培養上清から、限外ろ過、ゼラチンアガロースカラム、抗TIMP-1モノクローナル抗体結合セファロース4B、抗フィブロネクチン抗体結合セファロース4Bなどによりクロマトグラフィーにかけ精製して得られたヒトプロMMP-9を免疫原としてマウスを免疫し、免疫マウスからの脾細胞を用い細胞融合法で作成されるハイブリドマクローンから得られる。得られた抗ヒトMMP-9モノクローナル抗体のうち、少なくとも活性型MMP-9を認識する抗体を使用することができる。抗ヒトMMP-9モノクローナル抗体は、Fujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 231, 79-88, 1994に記載のモノクローナル抗体のうち、親和性の強いクローン73-18B3（生工研受託番号FERM P-13695）からの抗体を用いることにした。この抗体は、MMP-9の中央領域を認識し、潜在型及び活性型MMP-9を認識する抗体である。同様にしてMMP-3、-8、-10、-11、-12及び-13並びにMT-MMPに対するそれぞれのモノクローナル抗体を調製し、適切なクローンを選択して使用できる。

## 【手続補正17】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0050

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0050】活性型MMP-9は、ヒト線維肉腫細胞HT1080培養上清から精製した潜在型MMP-9を緩衝液Aに溶解し、1mM APMAで37℃、24時間インキュベーションすることにより得た（Y. Okada et al., J. Biol. Chem., 267, 21712-21719, 1993）。SDS-PAGE上潜在型MMP-9が活性型MMP-9に活性化されたことを確認した。MMP-3（Y. Okada et al., Biochem. J., 254, 731-741, 1988）、MMP-8（V. Knauper et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler., 371, 295-304, 1990）、MMP-10（A. J. Park et al., J. Biol. Chem., 266, 1584-1590, 1991）、MMP-11（D. Pei et al., J. Biol. Chem., 269, 25849-25855, 1994）、MMP-12（S. D. Shapiro et al., J. Biol. Chem., 268, 23824-23829, 1993）、MMP-13（J. M. P. Freije

et al., J. Biol. Chem., 269, 16766-16773, 1994）、MT-MMP（特願平6-331305号）についても各活性型MMPを調製して、同様にして使用できる。

## 【手続補正18】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0055

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

## 【0055】3）活性型MMP-9の定量法

実施例4に記載した活性型MMP-9を標準とし、既知濃度の活性型MMP-9あるいは遊離の活性型MMP-9を含む検体を96穴ビニルプレートに各々20 $\mu$ l加えた。次に実施例2（b）項で調製したrTIMP-2-IgG-HRP複合体を18 $\mu$ g/mlとなるように緩衝液Bで希釈し、上記ビニルプレートに各々100 $\mu$ lずつ加え混合した。この混合液を前記（a）項で調製したマウス抗ヒトMMP-9抗体（クローンNo. 73-18B3）結合プレート100 $\mu$ lに加え、以下の操作は上記1）と同様に行った。検量線を図3に示した。この測定系の感度は標準0ng/ml値+2S.D. から5ng/ml（84pg/アッセイ）であり、直線性は10~320ng/ml（0.17~5.3ng/アッセイ）の範囲で認められた。同様にしてMMP-3、-7、-8、-10、-11、-12及び-13並びにMT-MMPについてもそれぞれの活性型MMPを分別定量する。

## 【手続補正19】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0056

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

## 【0056】実施例6 ヒト関節液中及びヒト血清中活性型MMPsの定量

検体として組織破壊の進行している慢性関節リウマチ（RA）及びコントロールとしての変形性関節症（OA）患者の関節液、及びヒト血清を用い、RA患者血清でレベルの上昇が認められているMMP-2（N. Fujimoto et al., Clin. Chim. Acta, 221, 91-103, 1993）を実施例5（b）項2）に記載の方法でrTIMP-1-HRP及び抗MMP-2抗体を用いて遊離の活性型MMP-2を測定した。OA患者関節液及びヒト血清中の遊離の活性型MMP-2濃度は、すべてこの定量法の感度以下であった。一方、組織破壊の進行しているRA患者関節液中の遊離の活性型MMP-2濃度は、一部感度以下であったが、OA患者関節液及びヒト血清中の遊離の活性型MMP-2濃度よりも著しく高かった（図4）。OA患者関節液及びヒト血清中で活性型MMP-2は検出されなかったが、これら検体中には遊離状態のTIMPsが存

在することが知られており、遊離状態の活性型MMPsが存在しないことと一致する。例として活性型MMP-2定量法の臨床応用例を示したが、その他にも組織破壊、炎症あるいは癌転移などの疾患をもつ患者からの細

胞、組織ホモジネート、関節液、血液あるいは尿などにおいて、本定量法により遊離状態の活性型MMPsの分別定量が可能となる。

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
/(C12P 21/08 C12R 1:91)				

(72)発明者 東海 秀明  
富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内

(72)発明者 品川 朗  
富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内

(72)発明者 吉田 真一  
富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内

(72)発明者 岩田 和士  
富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内